

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e delle Produzioni Animali

Dottorato di Ricerca in
Valorizzazione e Gestione delle Risorse Agro-Forestali
Indirizzo: Bonifica e Difesa del Suolo
XX Ciclo

**Mal dell’esca della vite: studio dell’alterazione del legno e dei
processi fisiologici associati alla malattia per il miglioramento
della risposta di difesa della pianta**

Docente guida
Dott. Carmine Amalfitano

Candidata
Dott.ssa. Diana Agrelli

Coordinatore
Prof. Antonio Cioffi

Triennio 2004-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
Premessa	1
Problematica del mal dell'esca	4
I funghi dell'esca	8
Meccanismi di difesa delle piante	12
Meccanismi di difesa della vite	17
Obiettivi della tesi	22
2. MATERIALI E METODI	23
Isolamento delle fitoalessine	23
Analisi HPLC degli estratti metanolici dei legni	24
Reazione di Fenton	26
Analisi chimiche e FT-IR dei legni	28
Analisi NMR ¹³ C CP-MAS dei legni	29
Concimazioni fogliari	31
Analisi chimiche degli acini	35
Raccolta dei campioni	35
Determinazioni dell'acidità totale, del pH, degli zuccheri riduttori e degli acidi organici	35
Determinazioni dei macro e microelementi	36
Monitoraggio dei sintomi fogliari e della mortalità	37
Analisi statistica	38
3. RISULTATI E DISCUSSIONI	39
3.1 STUDI CONCERNENTI LA RISPOSTA FITOALESSINICA	39

Isolamento delle fitoalessine	39
Identificazione del composto 1	42
Identificazione del composto 2	52
Identificazione del composto 3	62
Analisi HPLC degli estratti metanolici dei legni	74
Reazione di Fenton sugli estratti metanolici dei legni	77
Prodotti della reazione di Fenton su resveratrolo ed ϵ -viviferina	93
Discussione	95
3.2 ANALISI DEI LEGNI	98
Analisi chimiche	98
Analisi spettroscopiche NMR ^{13}C CP-MAS e FT-IR dei legni	99
Analisi spettroscopiche NMR ^{13}C CP-MAS dei residui ligninici	106
Discussione	113
3.3 CONCIMAZIONI FOGLIARI	115
Mortalità nei vigneti	115
Sintomi fogliari	116
Analisi chimiche della produzione	118
Discussione	120
4. CONCLUSIONI	123
5. BIBLIOGRAFIA	125

INTRODUZIONE

Premessa

L'uso dei pesticidi è una pratica antica, già a partire dagli anni AC e a seguire fino al XX secolo venivano usati prodotti naturali per la protezione delle colture (Gavrilescu, 2005). Il primo pesticida sintetico è diventato disponibile nel 1940 generando un grande beneficio nell'aumentare le produzioni. Preoccupazioni per l'avverso impatto dei pesticidi sull'ambiente e sulla salute umana cominciarono ad essere espresse nei primi anni '60. Da allora il dibattito sui rischi e benefici dei pesticidi non è cessato e un'enorme quantità di ricerche sono state condotte sull'impatto dei pesticidi sull'ambiente (Werf, 1996). Attualmente si stima che nel mondo ogni anno sono applicati circa 4 milioni di tonnellate di pesticidi sulle colture, in più di 500 formulazioni, ma meno dell'1% colpisce il parassita bersaglio, il resto è disperso nell'ambiente, principalmente nel suolo, dando problemi di persistenza e tossicità, infatti inevitabilmente l'uso di pesticidi nell'agricoltura conduce all'esposizione di organismi non target (incluso l'uomo) a indesiderabili effetti collaterali (Pimentel, 1995; Werf, 1996; Gavrilescu, 2005).

L'impatto ambientale dei pesticidi dipende dalla loro dispersione e dalla risultante concentrazione e ripartizione nell'ambiente, dal tasso di degradazione e dalla loro tossicità. Una grande porzione di pesticidi raggiunge il suolo e può avere diversi destini: assorbimento e legame con componenti organici e minerali del suolo, assorbimento da parte delle radici delle piante, dilavamento e degradazione. L'assorbimento dei pesticidi nel suolo ne riduce la mobilità e ne influenza quindi la disponibilità alla degradazione e la possibilità di contaminare le acque. L'interazione col suolo dipende dalle proprietà fisico-chimiche del suolo così come dalle caratteristiche molecolari del pesticida. Una significativa porzione, tra il 20 e il 70%, dei pesticidi o dei loro prodotti di degradazione può rimanere nel suolo come residuo persistente legato ai colloidi. La trasformazione o la degradazione è il maggiore processo di perdita per molti pesticidi dopo la loro applicazione. Un pesticida è suscettibile a decomposizione fotochimica, chimica e microbica. La degradazione potrebbe cambiare molti pesticidi in residui non tossici, ma anche in prodotti ancora più pericolosi dell'originale, inoltre la degradazione di un pesticida risulta in un cambiamento di struttura che può influenzare anche la traslocabilità nell'ambiente. La biodegradazione è la principale via di degradazione dei pesticidi nel suolo ed è il risultato del metabolismo microbico, occorre quando i

microrganismi usano il pesticida come fonte di carbonio ed energia. Ci sono due principali ragioni per cui questi composti persistono nell'ambiente: non sono presenti le condizioni necessarie per la loro biodegradazione (i microrganismi capaci di biodegradarli sono assenti dal sito contaminato, o, se presenti, alcuni fattori limitanti, come ad esempio i nutrienti, possono creare condizioni sfavorevoli per la biodegradazione), oppure i composti possono essere resistenti alla biodegradazione (molti pesticidi sono sintetici e quindi la struttura della loro molecola può essere molto differente dalle strutture presenti in natura). Inoltre i pesticidi possono essere degradati ad una velocità diversa dipendente dalla loro struttura chimica. I microrganismi del suolo possono degradare un pesticida in pochi giorni, mentre altri pesticidi possono impiegare centinaia o migliaia di anni per essere degradati (Werf, 1996; Cornejo e Jamet, 2000; Gavrilesu, 2005).

Molti pesticidi sono tossici e quindi sono stati banditi quando è stata scoperta la loro pericolosità. Sfortunatamente, in molti casi, questi composti sono persistenti in natura. Molto tempo dopo il loro uso rimangono nel suolo e i loro residui entrano nella catena alimentare, oltre a non essere totalmente selettivi per l'organismo target e quindi altri organismi possono esserne danneggiati. Mentre dati sulla tossicità acuta sono disponibili per tutti i pesticidi, quelli sulla tossicità cronica sono insufficienti per molti di essi. Gli effetti tossici di natura cronica possono essere molto diversi e portare a fenomeni come carcinogenesi, immunodisfunzioni, mutagenesi, neurotossicità e teratogenesi, ma è comunque difficile prevedere gli effetti a lungo termine. Inoltre è importante considerare anche gli effetti negativi che i pesticidi possono avere sulla microflora del suolo, la quale ha un ruolo critico nel mantenerne la fertilità (Werf, 1996; Gavrilesu, 2005).

L'impatto negativo dell'uso dei pesticidi sulla salute umana e sull'ambiente ha attratto più e più attenzioni. Il loro potenziale come possibili cancerogeni e la loro presenza nell'aria, acqua e suolo spesso pone questioni sul loro continuo uso in agricoltura. Molti metodi sono stati proposti per valutarne l'impatto ambientale (soprattutto basati su modelli di simulazione e indicatori d'impatto) e inoltre la ricerca di tecniche per la decontaminazione e detossificazione degli ambienti inquinati è ancora molto intensa ed è sempre più orientata a tecniche di bioremediation e phytoremediation più che a tecniche che fanno uso di metodologie chimiche o fisiche, ma comunque tutte queste metodologie presentano ancora molti problemi e limitazioni per la loro attuazione e sono ancora in via di sviluppo (Werf, 1996; Gavrilesu, 2005; Mackova *et al.*, 2006).

Azioni per ridurre o eliminare la produzione e l'uso di pesticidi o per limitare il loro impatto ambientale sono state avviate nel corso del tempo. I prodotti antiparassitari si sono evoluti negli anni verso formulazioni sempre più specifiche nella modalità d'azione, meno persistenti e meno tossiche nei confronti di organismi non bersaglio. I primi pesticidi utilizzati, verso la fine del 1800 e nei primi decenni del '900, comprendono infatti composti con un'azione aspecifica e sono principalmente composti inorganici dell'arsenico, del mercurio, del fluoro, dinitroortocresoli e sostanze di origine vegetale come il piretro e la nicotina. Agli inizi degli anni '40 si diffusero composti di sintesi, tra i quali il DDT, con un'azione più mirata ma con elevata persistenza e tossicità, si tratta principalmente di cloroderivati, fosfoderivati e carbammati. Successivamente si sono sviluppate formulazioni molto più specifiche e meno tossiche che comprendono soprattutto regolatori della crescita e altre sostanze che interferiscono direttamente con la fisiologia del parassita bersaglio (Muccinelli, 2006). Attualmente la legislazione è sempre più attenta e restrittiva, e regola e stabilisce i principi generali cui far riferimento nell'uso e nella produzione di pesticidi nuovi o già esistenti (Craven, 2000; Craven e Hoy, 2005; Gavrilescu, 2005). Inoltre negli ultimi anni si sono istituiti accordi internazionali per stabilire le azioni da attuare a livello mondiale per eliminare e diminuire l'uso di alcune sostanze nocive per la salute umana e per l'ambiente. La convenzione di Stoccolma per il controllo degli inquinanti organici persistenti (POP), stabilita nel maggio del 2001 ed entrata in vigore nel maggio del 2004, è stata firmata da 150 Paesi e riguarda la riduzione e l'eliminazione del rilascio di 12 inquinanti di cui 8 pesticidi (aldrin, clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrin, endrin, eptacloro, mirex, toxafene).

Parallelamente negli ultimi decenni si è diffusa sempre di più la tendenza all'uso di tecniche di lotta alle malattie delle piante alternative all'uso di pesticidi, incentivate anche da provvedimenti legislativi (ad es. in Europa con il piano di sviluppo rurale, regolamento N° 1257/99), quali l'agricoltura biologica ed integrata. In questi tipi di approccio si cerca ridurre al minimo (agricoltura integrata) o eliminare (agricoltura biologica) l'uso delle sostanze chimiche di sintesi, preservando la salute umana, l'ambiente e la qualità delle produzioni, e dando spazio principalmente all'utilizzo di organismi naturali antagonisti dei parassiti delle colture, all'utilizzo di pesticidi di origine naturale e a più idonee pratiche colturali che prevengano lo sviluppo di malattie e salvaguardino il mantenimento dell'integrità del suolo. L'agricoltura biologica fa riferimento ad una filosofia più drastica che esclude totalmente l'uso di tutto ciò che non considera naturale, come pesticidi di sintesi e tecniche alternative

come l'uso di piante transgeniche, anche se tutto ciò suscita continui dibattiti sul significato di naturale. Nel mondo attualmente 24 milioni di ettari sono coltivati con metodi biologici, di cui la maggior parte sono localizzati in Australia (circa 10 milioni di ettari), Argentina (3 milioni di ettari) e Italia (1.2 milioni di ettari corrispondenti all'8% del totale dell'area coltivata). In Europa l'agricoltura biologica si è sviluppata rapidamente a partire dagli anni '90 e sono tuttora in continuo aumento le aree destinate a coltivazione biologica; è stimato che 5,5 milioni di ettari erano coltivati con metodi biologici nel 2004 contro i 7 milioni di ettari stimati nel 2006. L'Italia è uno dei Paesi in cui l'agricoltura biologica si è maggiormente diffusa e attualmente è regolata dal regolamento CE n° 834/2007 (dati FAO e MiPAAF).

Sempre nel concetto di agricoltura a basso impatto ambientale rivestono grande interesse le strategie di difesa delle piante da malattie e infestazioni, ma anche da stress di natura abiotica, basate sullo sviluppo e l'amplificazione delle capacità di resistenza endogene delle piante. Molta ricerca è impegnata in questo campo e principalmente è orientata allo studio di piante transgeniche (Lorito *et al.*, 2004), anche se ancora oggi ne è impossibile l'utilizzo e sono popolarmente poco accettate, e all'induzione artificiale della difesa della pianta con induttori applicati esogenamente o con bioinduttori (Lorito *et al.*, 2004). Più di recente si sta sviluppando la biologia funzionale basata sulla manipolazione con pratiche culturali della normale fisiologia della pianta per superare alcune avversità nello sviluppo delle colture (Maggio, 2005). Tutto questo però deve necessariamente passare per lo studio della fisiologia e della biochimica legate alla crescita e alla difesa della pianta per individuare i meccanismi da poter manipolare (Lorito *et al.*, 2004; Maggio, 2005).

Problematica del mal dell'esca

Tutte le specie del genere *Vitis* sono attaccate dal mal dell'esca, pur rilevandosi una diversa sensibilità tra le specie e nell'ambito delle cultivar (Gaudinon, 1959; Geoffrion, 1982). La malattia è diffusa nelle zone viticole di tutto il mondo (Galet, 1997); in Italia il mal dell'esca è presente in tutte le zone di tradizione viticola e in molte aree la malattia è presente nel 90-100% di vigneti con un'incidenza annua variabile, nei vigneti di 15-25 anni, dall'1 al 50% e un incremento medio annuo valutato fra il 4 e il 5%, la percentuale annua di piante colpite da apoplezia si colloca invece intorno al 2% (Mugnai *et al.*, 1999).

Il mal dell'esca è una malattia di origine fungina, i cui principali agenti patogeni risultano essere tre funghi colonizzatori del legno, *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) e *Fomitiporia mediterranea* (Fomed) la cui

penetrazione avviene da tagli di potatura o ferite nel tronco della pianta (Mugnai *et al.*, 1999). La presenza di tutti e tre i funghi genera “l’esca propria”, che attualmente è considerata un complesso di malattie, infatti ognuno dei tre funghi può essere agente primario di malattie caratterizzate da alcuni degli stessi sintomi del mal dell’esca (black goo, esca giovane, carie bianca) (Graniti, 2000; Surico, 2001).

L’alterazione del legno progredisce nel tempo ma la pianta può continuare a vivere e produrre per alcuni anni (forma cronica), tuttavia la malattia può manifestarsi anche in forma acuta con l’improvviso appassimento dell’intera pianta (apoplessia) (Mugnai *et al.*, 1999).

La malattia si presenta con sintomi interni al tronco e sintomi su foglie e acini. Il decadimento nel legno inizia generalmente da un’ampia ferita da potatura e si estende successivamente al tessuto legnoso e può diffondere verso l’alto e verso il basso diminuendo di intensità a partire dal punto di origine; talvolta il marciume affiora causando spaccature lungo il tronco (mal dello spacco) (Mugnai *et al.*, 1999). La zona del colletto viene interessata solo eccezionalmente dal processo di alterazione e sulle radici non sono mai state riscontrate lesioni (Cavanni *et al.*, 1987). Nel legno infetto si possono distinguere diversi tipi di alterazione: zone di marciume bianco con consistenza soffice e friabile, una linea di tessuto legnoso di colore nero che separa il legno sano dal legno decaduto, zone di colore bruno-rosso, e striature nere in sezione longitudinale che corrispondono a vasi xilematici occlusi da sostanze nere gommose (Mugnai *et al.*, 1999). I sintomi sulle foglie appaiono come macchie rotonde o di forma irregolare, di un colore verde pallido o clorotiche, localizzate tra le venature o lungo i margini della foglia, che generalmente diffondono verso la parte distale al germoglio e gradualmente si espandono e si fondono, divenendo in parte necrotiche e di colore marrone o rosso bruno, e lasciano solo una stretta striscia di tessuto verde lungo le nervature principali, il cosiddetto profilo “tigrato” (Fig. 1.1a). Dei sintomi fogliari non se ne conosce la causa ma si ipotizza che siano dovuti a occlusioni vascolari che creano stress idrici (Van Alfen, 1989; Mugnai *et al.*, 1999) o all’azione tossica di metaboliti fungini (Sparapano *et al.*, 1998; Evidente *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000). Inoltre le piante malate non mostrano tutti gli anni i sintomi fogliari, di questa discontinuità non se ne conosce la causa e rende problematica l’individuazione e il riconoscimento a ripresa vegetativa delle piante malate. I sintomi sugli acini (Fig. 1.1b), talvolta non accompagnati dai sintomi sulle foglie, compaiono spesso all’invaia e consistono in macchie necrotiche sull’epidermide degli acini (Mugnai *et al.*, 1999). Comunque si è riscontrata una sostanziale similitudine tra piante sane e malate

a



b



Fig. 1.1. Tipici sintomi su foglie (a) e bacche (b) di viti affette da mal dell'esca.

asintomatiche negli aspetti quantitativi e qualitativi della produzione (Calzarano *et al.*, 2001; Calzarano *et al.*, 2004).

Si ipotizza comunque che esistano relazioni tra espressione della malattia e fattori climatici come temperature e pioggia, ma non sono ancora chiari (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2000).

La forma apoplettica del mal dell'esca appare improvvisamente a metà della stagione estiva causando un rapido appassimento di intere piante di vite, compresi i grappoli, e raramente solo dei rami. Foglie sane divengono prima verde pallido poi grigio verde e rapidamente avvizziscono, seccandosi completamente in pochi giorni. L'apoplezia potrebbe essere favorita da estati calde, in particolare da condizioni per le quali a periodi piovosi segue un caldo secco (Mugnai *et al.*, 1999).

Per il controllo della malattia il fungicida risultato più efficace è stato l'arsenito di sodio, che però è stato bandito per motivi di ordine tossicologico ed ambientale già nel 1944 in Germania, nel 1977 in Italia e nel 2001 anche in Francia, ultimo paese ad utilizzarlo ancora. Altri prodotti sono stati provati come ad esempio DNOC (dinitroortocresolo) (anche questo bandito nel 1999), derivati triazolici, forsetil alluminio; alcuni di essi hanno mostrato risultati preliminari incoraggianti, come ad esempio una riduzione dei sintomi, ma sono ancora in fase di studio (Mugnai *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2000), così come altre tecniche alternative come ad esempio l'utilizzo di *Trichoderma* come fungo antagonista o trattamenti con acqua calda in vivaio (Mugnai *et al.*, 1999; Crous *et al.*, 2001; Fourie *et al.*, 2001; Rooney e Gubler, 2001).

Attualmente quindi non esistono efficaci metodi di lotta e il controllo è affidato esclusivamente a interventi preventivi della diffusione dell'infezione come: asportare tempestivamente le piante morte o irrimediabilmente colpite, rimuovere il materiale infetto rimanente dopo il risanamento dei ceppi colpiti, disinfettare gli attrezzi di potatura, evitare grossi tagli e disinfettare le ferite con mastici cicatrizzanti contenenti fungicidi a ampio spettro, trattare con fungicidi le viti dopo gravi gelate, potare prima le viti sane e dopo quelle malate o quelle che potrebbero non essere sane, scegliere materiale sano per i nuovi impianti (Mugnai *et al.*, 1999).

I funghi dell'esca

Due dei funghi patogeni dell'esca, Pch e Pal (di Pal recentemente ne è stata isolata la forma perfetta che è l'ascomicete *Togninia minima* (Pascoe *et al.*, 2004)), sono funghi mitosporici tracheomicotici, quindi colonizzano il tessuto xilematico, e sono stati rinvenuti principalmente nel legno alterato di colore bruno-rosso e nelle striature nere del tronco di viti malate (Mugnai *et al.*, 1999). Entrambi i funghi non sembrano avere attività ligninolitica, infatti non posseggono i tipici enzimi degradativi della lignina, comunque in alcuni ceppi è stata riscontrata la presenza di attività laccasica, perossidasi e fenolossidasi (Mugnai *et al.*, 1997a; Mugnai *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2006), e inoltre si è osservata la capacità di crescita su substrati con acido gallico come unica fonte di carbonio (Mugnai *et al.*, 1997b). Pch e Pal sembrano invece possedere alta attività enzimatica per la degradazione dei carboidrati come amidi e pectine, mentre in vitro non sono capaci di degradare cellulosa cristallina, posseggono infatti endo-1-4- β -glucanasi, glucosidasi, poligalatturonasi e polimetilgalatturonasi, mancano invece di eso-glucanasi (Mugnai *et al.*, 1997a; Mugnai *et al.*, 1999; Marchi *et al.*, 2001). Per questi due funghi inoltre è stata accertata la produzione *in vitro* di metaboliti secondari, rilasciati nel mezzo di coltura, che sembrano avere attività fitotossica o riducente del Fe^{3+} (Sparapano *et al.*, 1998; Evidente *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000; Di Marco *et al.*, 2001).

Funghi degradatori del legno con bassa attività ligninolitica sono i brown e i soft rot, di cui le caratteristiche di degradazione sono state studiate ponendo ipotesi sul meccanismo di azione. Queste ipotesi possono essere un valido supporto per la comprensione dell'azione di Pch e Pal.

I funghi del marciume molle (soft rot) sono poco specializzati e generalmente sono saprofiti appartenenti ai raggruppamenti di ascomiceti e deuteromiceti. Si sviluppano nel lume delle cellule legnose e producono ramificazioni sottili che penetrano attraverso la parete formando cavità nello strato celluloso S2. Degradano cellulosa ed emicellulose, ed hanno scarso effetto sulla lignina che rimane più o meno integra (Deacon, 2000). Vengono distinti in due tipi: il tipo 1 degrada lo strato S2 con formazione di cavità romboidali attorno alle singole ife; il tipo 2 degrada l'intera parete secondaria S2. In genere questi funghi non degradano la lamella mediana (Blanchette, 2000; Blanchette *et al.*, 2004). Gli enzimi coinvolti nella degradazione ad opera di questi funghi non sono ben conosciuti, ma sembra posseggano i tipici enzimi cellulastici (eso-glucanasi, endo-glucanasi, glucosidasi), infatti sono capaci di degradare la cellulosa cristallina, ma anche alcune fenolossidasi (Blanchette, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Inoltre è stato riportato che producono *in vitro* radicali $\cdot\text{OH}$ (Tanaka *et al.*, 2000;

Hammel *et al.*, 2002). I funghi del marciume molle richiedono concentrazioni elevate di azoto (circa l'1%) e di umidità, e per questo sono i funghi caratteristici del deterioramento delle palizzate in quanto possono ricavare azoto dal terreno circostante (Deacon, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Sono inoltre considerati funghi particolarmente attivi in ambienti sfavorevoli ai brown e white rot (Kim e Sing, 2000). Comunque il loro sistema enzimatico è molto simile a quello dei funghi della carie bianca, ma differisce per gli enzimi ossidativi coinvolti nell'ossidazione e degradazione della lignina (Kirk e Cowling, 1984).

Gli agenti della carie bruna (brown rot) sono prevalentemente basidiomiceti, la dizione carie bruna fa riferimento al colore caratteristico del legno degradato, in quanto i funghi degradano gran parte della cellulosa e delle emicellulose lasciando la lignina più o meno intatta sotto forma di una struttura brunastra. Le ife sviluppano nel lume cellulare, come nel caso del marciume molle, ma il quadro degradativo è diverso in quanto lo strato parietale S2 viene degradato quasi completamente a distanza dalle ife, che generalmente sono a contatto con lo strato S3 che però rimane intatto (Illman, 1991). Inoltre la degradazione è tipicamente irregolare, con alcuni gruppi di cellule legnose profondamente alterate ed altre solo parzialmente. La capacità di causare degradazione generalizzata della cellulosa è di difficile comprensione in termini di diffusione dei rispettivi enzimi cellulastici. In realtà le cellulasi prodotte dai funghi della carie bruna, a differenza di quelle prodotte dai funghi del marciume molle, hanno scarso effetto *in vitro* sulla cellulosa (Deacon, 2000). Inoltre gli enzimi sembrano essere troppo grandi per penetrare la parete cellulare, per cui per questi funghi è ipotizzata una degradazione della cellulosa attraverso un processo ossidativo che coinvolge la produzione di H_2O_2 . Date le ridotte dimensioni, la molecola di H_2O_2 può diffondere attraverso le pareti e dare origine alla reazione di Fenton in presenza di ferro ridotto, causando un deterioramento generalizzato (Illman, 1991; Goodell *et al.*, 1997). La produzione di H_2O_2 avverrebbe attraverso l'enzima cellobiosio riduttasi (Hammel *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2003) e l'innescò della reazione di Fenton avverrebbe attraverso la riduzione del ferro per reazione redox con metaboliti secondari chelanti il ferro secreti dai funghi (Goodell *et al.*, 1997). I radicali idrossilici prodotti sarebbero in grado di intaccare la struttura della cellulosa cristallina e depolimerizzare i carboidrati per rottura del legame etero (Kerem, *et al.*, 1998; Hammel *et al.*, 2002). Su questi carboidrati resi più disponibili all'attacco del fungo dall'azione dei radicali $\cdot OH$ opererebbero poi gli enzimi cellulastici. I funghi brown rot sembrano possedere solo endo-glucanasi e glucosidasi, mancano di eso-glucanasi, infatti non riescono a degradare *in vitro* la cellulosa in forma cristallina, cosa che avviene solo con la

partecipazione di tutti e tre gli enzimi (Eriksson, 1981; Kirk e Cowling, 1984; Kleman-Leyer *et al.*, 1992; Green III *et al.*, 1996; Deacon, 2000). In più sembra particolarmente importante nello sviluppo dei funghi brown rot l'utilizzo delle sostanze pectiche (Green III *et al.*, 1996). I funghi della carie bruna non posseggono gli enzimi per la degradazione della lignina, che nei legni attaccati da questi funghi appare solo con modificazioni come idrossilazione, demetilazione, lieve depolimerizzazione e ossidazione della catena laterale, alterazioni probabilmente dovute all'azione dei radicali $\cdot\text{OH}$ che aprono ulteriormente la strada agli enzimi verso i polisaccaridi (Kirk e Cowling, 1984; Filley *et al.*, 2002; Hammel *et al.*, 2002). Comunque in alcuni casi è stata descritta anche la degradazione degli anelli aromatici della lignina da parte di funghi brown rot, e l'azione sulla lignina sarebbe tanto più intensa quanto più il fungo si trova in assenza di carboidrati semplici di facile utilizzazione (Kirk *et al.*, 1980; Deacon, 2000; Kamada *et al.*, 2002). La degradazione dei funghi della carie bruna può essere simulata *in vitro* trattando legname unicamente con H_2O_2 (Deacon, 2000).

Il terzo fungo patogeno dell'esca, Fomed, è un basidiomicete ed è responsabile del marciume bianco. E' stato da poco riclassificato col suo attuale nome, infatti fino a pochi anni fa veniva classificato come *Fomitiporia punctata* (Fisher e Kassemeyer, 2004). Questo fungo possiede le tipiche attività enzimatiche dei funghi ligninolitici e non è ancora chiaro se si espanda secondo il modello CODIT (compartmentalisation of decay in trees) nel quale l'espansione è condizionata dalla risposta della pianta che forma man mano barriere statiche di difesa, o secondo il modello CM (conditioning of microenvironment) nel quale l'espansione è condizionata da fattori nutrizionali e fisici (Mugnai *et al.*, 1999).

I funghi della carie bianca (white rot) comprendono sia ascomiceti che basidiomiceti. Degradano cellulosa, emicellulosa e lignina simultaneamente o preferenzialmente la lignina; il legno rimane di colore chiaro dopo la degradazione (Blanchette, 2000; Deacon, 2000). Lo schema di colonizzazione può variare, ma se le ife sono presenti nel lume cellulare, causano un progressivo assottigliamento delle pareti delle cellule legnose iniziando dallo strato S3. Impiegano enzimi cellulastici convenzionali per il deterioramento dei carboidrati del legno e sono particolarmente efficienti nell'utilizzazione dell'azoto. La caratteristica principale di questi funghi è la capacità di degradare completamente la lignina, che è un polimero tridimensionale complesso, costituito da unità fenilpropaniche legate l'una all'altra con modalità diverse. La degradazione di un polimero di questo tipo richiederebbe una moltitudine di enzimi convenzionali. L'intervento di tutti questi enzimi sembra poco probabile, in quanto nel corso della degradazione della lignina ad opera di funghi della carie

bianca è stata evidenziata una gamma estremamente ampia di composti intermedi, diversi da quelli attesi a seguito di una normale degradazione enzimatica. In realtà si è visto che la lignina viene ossidata dai funghi della carie bianca. Il processo coinvolge una serie di enzimi diversi, alcuni dei quali capaci di funzionare da generatori di composti ossidanti ed altri di catalizzare l'apertura di anelli aromatici. Gli enzimi coinvolti principalmente nella produzione e nel trasferimento di ossidanti comprendono laccasi, gliossal ossidasi, manganese perossidasi e ligninasi (Deacon, 2000). La laccasi in presenza di ossigeno catalizza l'ossidazione dei fenoli a fenossi radicali per estrazione dell'idrogeno fenolico; la gliossal ossidasi genera H_2O_2 a partire da glucosio; la manganese perossidasi ossida manganese (II) a manganese (III) in presenza di H_2O_2 come substrato e di chelatori organici come glicolato o ossalato, che stabilizzano il Mn(III) promuovendone il rilascio dall'enzima, il risultante chelato con il Mn(III) è piccolo e può diffondere ed agire a distanza dal sito attivo dell'enzima, tuttavia non è molto ossidante e riesce ad ossidare solo strutture fenoliche per estrazione dell'idrogeno dal gruppo idrossilico (il fenossi radicale così formato generalmente evolve nella rottura del legame C α -arile), ma non riesce ad attaccare le strutture aromatiche con tutti i gruppi fenolici impegnati in legami eterei, che predominano nella lignina, quindi essenzialmente è utile ad iniziare l'attacco su legno sano essendo piccolo e diffusibile (Hammel, 1996); la ligninasi (lignina perossidasi) catalizza l'ossidazione di aril-eteri per estrazione di un elettrone dall'anello aromatico, e il risultante catione arilico radicalico può essere soggetto ad altre reazioni post-enzimatiche come rottura del legame C α -C β o rottura dei legami eterei con conseguente depolimerizzazione (Hammel, 1996). La demolizione dell'anello è catalizzata dall'inserimento in orto di un gruppo idrossilico nei composti fenolici, anche per demetossilazione di guaiacili e siringili, a questo punto l'anello viene aperto tra i due atomi di carbonio idrossilati. Il processo ha luogo con l'anello ancora attaccato alla macromolecola di lignina ed è denominato *orto* fissione, in contrasto alla *meta* fissione impiegata invece dai batteri nella degradazione degli anelli fenolici. Comunque queste ossidazioni iniziali, coinvolgenti il trasferimento di singoli elettroni, generano condizioni altamente instabili dando il via ad una catena di ossidazioni chimiche. Evidentemente la degradazione dipende strettamente dalla presenza di ossigeno e quindi non ha luogo in condizioni di forte idratazione. Inoltre composti ossidativi intermedi possono essere tossici per il fungo stesso. Infatti questi funghi *in vitro* generano questi composti a partire da unità fenilpropaniche, ma li detossificano mediante polimerizzazione tipo melanine. Questo processo non sembra

frequente nel legname, tranne quando due colonie di funghi si incontrano, in questo caso nelle zone di contatto formano linee zonali dense e fortemente melaninizzate (Deacon, 2000).

Meccanismi di difesa delle piante

Tutte le piante hanno evoluto una serie di meccanismi di difesa per proteggersi dagli stress biotici dovuti a microrganismi patogeni o insetti. Alcune delle difese sono definite costitutive perché indipendenti dalla presenza degli stress biotici stessi. Rientrano in questa categoria le barriere anatomiche e una serie di composti di diversa natura chimica ad azione tossica (composti antifungini preformati o fitoanticipine). In realtà molti dei caratteri di resistenza, e soprattutto le difese di natura chimica per proteggersi da attacchi di patogeni e insetti sono inducibili (Baldwin, 1998). Le difese indotte vengono attivate solo quando c'è necessità di resistenza, cioè solo quando la pianta viene attaccata. Tipicamente rientrano in questa categoria la produzione di sostanze chimiche (fitoalessine) con una azione tossica diretta nei confronti dei patogeni, e la produzione di proteine PR (Pathogenesis Related protein). E' da notare che la pianta quando è attaccata non solo risponde localmente alla presenza del patogeno o dell'insetto, ma attiva anche una serie di vie metaboliche che portano ad una risposta cosiddetta sistemica, ossia che si verifica distalmente al sito attaccato e che coinvolge quindi l'intera pianta. Quando la resistenza avviene contro microrganismi patogeni (mediata da acido salicilico) si parla di Resistenza Sistemica Indotta (ISR) o Resistenza Sistemica Acquisita (SAR), se la resistenza avviene contro insetti (mediata da acido jasmonico) viene chiamata Resistenza Indotta contro Erbivori (IRH) (Heil, 2002).

La superficie della pianta rappresenta la prima linea di difesa contro il patogeno, ad esempio gli spessori di cera, cutina, suberina e lignina, strutture che sono normali costituenti delle pareti cellulari, sono difficilmente aggredibili da parte dei microrganismi; cuticola spessa e maggiore lignificazione delle pareti delle cellule accrescono la resistenza verso quei patogeni che effettuano la penetrazione diretta e solo patogeni adattati all'ospite sono capaci di superare queste barriere poichè necessitano di enzimi specifici come ad esempio le cutinasi (Deacon, 2000; Jeandet *et al.*, 2002); Le superfici ricoperte da uno strato di cere rendono difficile il contatto tra le spore di un fungo e l'epidermide e contrastano la formazione di film d'acqua utili alla crescita e la moltiplicazione di funghi e batteri. Sulle foglie le caratteristiche degli stomi (numero, dislocazione, tempi d'apertura) e quelle dei tricomi possono essere fattori più o meno favorevoli alla penetrazione dell'ospite per dare inizio al processo di patogenesi (Levin, 1973; Deacon, 2000; Schulze-Lefert e Robatzek, 2006).

Molte piante posseggono inoltre metaboliti secondari sintetizzati costitutivamente che possono avere azione antimicrobica. Questi composti sono chiamati fitoanticipine e possono essere sintetizzati già nella forma attiva o come precursori inattivi (per esempio composti glicosilati) normalmente separati per compartimentalizzazione dagli enzimi che li attivano (VanEtten *et al.*, 1994; Morrissey e Osbourn, 1999). Conservare i composti in forma inattiva inoltre è anche un meccanismo che la pianta adotta per proteggersi essa stessa dalla loro tossicità (Wittstock e Gershenzon, 2002). Alcuni esempi di composti che appartengono alla classe delle fitoanticipine sono: le saponine (presenti in molte specie tra cui avena e pomodoro), alcaloidi e glicoalcaloidi (principalmente nelle *Solanaceae* o per es. la nicotina nel tabacco), glicosidi cianogenici (presenti in più di 200 specie di piante), acidi idrossicinnamici ciclici (presenti come glucosidi in molte *Graminaceae*), composti fenolici (ad esempio catecolo ed acido protocatechico nelle cipolle a scaglie rosse o gialle) (Pearce, 1996; Morrissey e Osbourn, 1999; Deacon, 2000). Molti frutti immaturi posseggono composti antimicrobici che però diminuiscono in concentrazione durante la maturazione, infatti i frutti maturi sono generalmente più suscettibili all'attacco di microrganismi (Morrissey e Osbourn, 1999; Deacon, 2000). La capacità di resistere e superare questo meccanismo difensivo delle piante è specifica per ogni patogeno e dipende dalle sue capacità di detossificare tali composti (Morrissey e Osbourn, 1999; Deacon, 2000). Inoltre molti di questi composti sono tossici per la pianta stessa.

Al momento di un attacco di un patogeno comunque si attivano una serie di altri meccanismi di resistenza, tra i quali c'è la formazione nel sito di infezione di sostanze che rinforzano la parete cellulare per conferirle maggiore resistenza alla penetrazione del patogeno. Infatti vengono incorporati composti di neoformazione come fenoli (che hanno anche azione tossica), lignina, callosio, suberina e anche proteine, che ispessiscono la parete e possono anche incapsulare le ife fungine (papille) (Pearce, 1996; Deacon, 2000). Nel caso di patogeni vascolari fungini inoltre si può avere la formazione nei vasi di occlusioni vascolari per formazione di gel di natura pectica e fenolica (Rioux *et al.*, 1998; Deacon, 2000) che ostacolano la diffusione del fungo. Con lo stesso scopo nei vasi si può avere anche formazione di tulle, che sono ingrossamenti a palloncino a partire dalle cellule del parenchima adiacenti ai vasi e che sviluppano attraverso i pori (Pearce, 1999; Deacon, 2000).

Di grande interesse sono anche le cosiddette proteine PR, proteine la cui sintesi viene indotta in maniera localizzata o sistemica da attacchi di insetti e patogeni e che hanno un ruolo importante nella resistenza delle piante. Sono conosciute centinaia di queste proteine, ritrovate

sia in spazi intracellulari che extracellulari, e non di tutte se ne conosce bene il ruolo. Sono divise in 11 classi in base alla loro sequenza amminoacidica e alla loro funzione. Le più conosciute e meglio caratterizzate sono le chitinasi e la β -glucanasi che sono enzimi capaci di degradare la parete cellulare fungina, questi due enzimi sono stati ritrovati in molte famiglie di piante. Altre proteine PR comprendono proteine capaci di legarsi alla chitina in formazione nella parete dei funghi inibendone così la crescita, proteine che alterano la permeabilità cellulare delle cellule del fungo, proteine RIPs che inattivano i ribosomi dei funghi, inibitori di proteasi, ecc. (Selitrennikoff, 2001; Deacon, 2000).

Altri composti la cui sintesi viene indotta nella pianta come meccanismo di difesa sono le fitoalessine. Sono metaboliti secondari a basso peso molecolare, generalmente lipofili e fungitossici, ad azione non specifica verso un particolare patogeno e prodotti in maniera massiccia nel sito di infezione. Appartengono a varie classi chimiche (fenoli, stilbeni, lignani, flavonoidi, alcaloidi, terpenoidi, dibenzofurani, ecc.) e vengono sintetizzati principalmente per tre vie metaboliche: via acetato-malonato, via acetato mevalonato, via dell'acido shikimico (Pearce, 1996; Morrissey e Osbourn, 1999; Deacon, 2000). La loro sintesi comunque è indotta da vari tipi di stress sia biotici che abiotici (Gottstein e Gross, 1992; Mert-Turk, 2002). E' stata dimostrata la relazione tra tolleranza di un patogeno alle fitoalessine e sua patogenicità (Morrissey e Osbourn, 1999).

Un meccanismo importante di difesa indotta nell'interazione tra ospite e patogeno è quello della reazione d'ipersensibilità (HR) o morte cellulare programmata (PCD). In questo caso nelle cellule a contatto con il patogeno ed in quelle immediatamente circostanti è indotta la morte per elevato accumulo di specie radicaliche dell'ossigeno, in queste cellule inoltre si accumulano fitoalessine creando un ambiente fungitossico localizzato; tutto questo nel suo insieme concorre a bloccare il patogeno (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Pearce, 1996; Deacon, 2000; Grant e Loake, 2000; Odjakova e Hadjiivanova, 2001; Mittler, 2002).

Tutti questi meccanismi di difesa messi in atto dalla pianta vengono attuati non solo nelle parti verdi ma anche nelle cellule vive del tronco delle piante legnose, e sono tutti indirizzati nella formazione di barriere che ostacolano l'espansione del patogeno. Infatti all'interfaccia tra le aree di legno sano e di legno infetto si ha la formazione di zone di reazione in cui si ha accumulo di fitoalessine, proteine PR, depositi di sostanze ad azione antimicrobica e rinforzante delle pareti cellulari come ad esempio polifenoli e composti ligninici. Secondo il modello CODIT (compartmentalisation of decay in trees) quando il patogeno riesce a superare questa barriera, si ha la formazione di una nuova barriera nella

nuova interfaccia tra legno sano e legno infetto (Pearce, 1996; Pearce *et al.*, 1997; Pearce, 2000; Schwarze e Baum, 2000).

Comunque lo sviluppo e il successo di un patogeno dipende dalla dinamica dei processi di attacco del patogeno e difesa della pianta, se il patogeno si sviluppa a velocità sufficiente è capace di superare le difese dell'ospite, in caso contrario l'infezione verrà contenuta e limitata (Deacon, 2000).

L'esplosione ossidativa con formazione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) è il primo evento che si verifica dopo la percezione di uno stress da parte della pianta e porta all'attivazione degli altri meccanismi difensivi poiché i ROI fungono da molecole segnale (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002). Generalmente i ROI sono prodotti dall'eccitazione dell' O_2 per formare $O_2^{\cdot 1}$ (ossigeno singoletto) e dal trasferimento di uno, due o tre elettroni per formare, rispettivamente $\cdot OOH$ (radicale superossido) e la sua base coniugata $\cdot O_2^-$, H_2O_2 (perossido d'idrogeno) e $\cdot OH$ (radicale ossidrilico). I ROI a differenza dell' O_2 sono capaci di ossidazioni ad ampio spettro che possono portare anche alla distruzione ossidativa della cellula (HR); tra le loro principali azioni ricordiamo la perossidazione dei lipidi di membrana, l'ossidazione delle proteine, l'inibizione di enzimi ed i danni al DNA o all'RNA (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002). Sebbene tutti i ROI sono particolarmente ossidanti e possono provocare danni, l' $\cdot OH$ in particolare è il più reattivo e dannoso, mentre l' H_2O_2 è la meno reattiva di per sé, anche se può dare origine in presenza di catalizzatori metallici ridotti alla reazione di Fenton con produzione di $\cdot OH$, e il radicale $\cdot O_2^-$ può riciclare il catalizzatore necessario a questa reazione (reazione di Haber-Weiss) (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Arora *et al.*, 2002). I ROI sono comunque anche sempre prodotti durante lo svolgimento delle normali attività metaboliche delle cellule come la fotorespirazione, la fotosintesi e la respirazione mitocondriale, ma la loro concentrazione è costantemente mantenuta bassa dai sistemi antiossidanti della pianta come superossido dismutasi (SOD), ascorbato perossidasi (APX), catalasi (CAT) e glutazione perossidasi (GPX), principalmente, ma anche da altre molecole ad azione antiossidante come acido ascorbico, glutazione, tocoferoli e polifenoli (Arora *et al.*, 2002; Mittler, 2002). Le SOD sono presenti in quasi tutti gli organelli cellulari e riducono il superossido ad H_2O_2 , il ciclo APX è presente nei cloroplasti, mitocondri, apoplasto e perossisomi e riduce l' H_2O_2 ad H_2O , la CAT è presente solo nei perossisomi e trasforma l' H_2O_2 in O_2 , la GPX è presente nel citosol e anche questa riduce l' H_2O_2 ad H_2O . Nelle cellule per garantire la detossificazione dei ROI è importante mantenere un rapporto costante forme ridotte/ossidate di questi antiossidanti, e ciò è garantito da specifici enzimi: glutazione

reduttasi (GR), monoidroascorbato reduttasi (MDAR) e diidroascorbato reduttasi (DHAR), tutti questi ultimi enzimi utilizzano principalmente l'agente riducente NADPH. Al contrario le CAT non hanno bisogno di agenti riducenti e quindi risultano indipendenti dallo stato redox delle cellule anche in caso di stress (Mittler, 2002). Gli stress aumentano la produzione di ROI per attivazione di enzimi come ammino ossidasi nell'apoplasto, perossidasi legate alla parete cellulare, e NADPH ossidasi, negli stress biotici, presente sulla membrana citoplasmatica capace di produrre direttamente superossido a partire dall'ossigeno. Il superossido oltre ad essere esso stesso tossico può essere ridotto ad H_2O_2 dalle SOD e l'incremento di quest'ultima può dare inizio alla reazione di Fenton con produzione di $\cdot OH$ estremamente dannoso. Per quanto riguarda gli stress abiotici, la pianta riduce la sintesi dei ROI contrastando gli stress responsabili di tale produzione con meccanismi quali: adattamenti anatomici delle piante (movimento ed arricciamento fogliare, sviluppo di epidermide che riflette la luce e posizionamento degli stomi in strutture specializzate etc.), adattamenti fisiologici (metabolismo CAM, C_4 etc.), ed infine con meccanismi molecolari (riarrangiamento dell'apparato fotosintetico o sua completa soppressione etc.). In alternativa, per ridurre la sintesi dei ROI gli elettroni nelle catene di trasporto elettronico di mitocondri e cloroplasti possono essere incanalati in modo alternativo, questa funzione è svolta da un particolare gruppo di enzimi chiamato ossidasi alternative (AOX); questi enzimi prelevano gli elettroni dalle catene di trasporto così da ridurre O_2 in H_2O , in questo modo la sintesi dei ROI è ridotta sia perché si previene la riduzione di O_2 a $\cdot O_2^-$, sia perché si riduce il livello di O_2 che è il substrato per la produzione dei ROI (Mittler, 2002). A differenza degli stress abiotici, dove la concentrazione dei ROI nella cellula aumenta ma viene comunque tenuta sotto controllo dai sistemi antiossidanti, l'attacco dei patogeni causa l'inattivazione di CAT e APX con conseguente accumulo di H_2O_2 che diffonde nella cellula ed insieme all'acido salicilico (SA) ed all'ossido nitrico (NO) attiva molte difese della pianta tra cui anche la PCD. Molto probabilmente, NO ed SA bloccano sia la produzione di APX (mediante meccanismi post-trascrizionali) che quella della CAT (sottoregolando l'espressione del corrispondente mRNA) e di conseguenza la pianta perde buona parte della sua capacità di detossificare la H_2O_2 che può anche evolvere a specie più reattive, come $\cdot OH$, e contribuire alla PCD. In realtà, l'incremento dei ROI non è solo negativo per la cellula, ma come detto in precedenza, tali molecole possono agire anche come indicatori di stress per la pianta poiché sono messaggeri coinvolti nel sistema di trasduzione del segnale che permette di attivare le risposte di difesa; però affinché ciò avvenga, è necessario che la pianta possieda almeno due meccanismi per

regolare la concentrazione cellulare dei ROI, ovvero una modulazione fine e la detossificazione dagli eccessi. Tra gli enzimi antiossidanti prima citati, quelli deputati alla eliminazione dell'H₂O₂ sono APX e CAT, ma mentre APX agisce su concentrazioni µM di H₂O₂, CAT su quelle mM, per cui APX sarebbe responsabile della modulazione fine della concentrazione dei ROI, mentre CAT della rimozione degli eccessi (Mittler, 2002). Per cui l'inattivazione di CAT e APX nel caso degli stress biotici ha la funzione di provocare la PCD (Grant e Loake, 2000; Mittler, 2002).

Sono molte le specie coinvolte nella trasduzione del segnale che serve ad attivare le difese della pianta, tra queste, le MAP-chinasi, la calmodulina, il Ca²⁺, l'acido salicilico, l'acido benzoico, l'acido jasmonico, l'ossido nitrico. Un modello di funzionamento prevede che in seguito alla percezione del patogeno la pianta attivi NADPH ossidasi con produzione di superossido che viene ridotto a H₂O₂ dalle SOD, e quest'ultima porta all'attivazione di MAP-chinasi a cascata e all'aumento di Ca²⁺ intracellulare che interagisce con la calmodulina attivando la Ca-calmodulina-chinasi, che consentono l'attivazione o disattivazione di fattori trascrizionali che regolano l'espressione di importanti geni di difesa responsabili della regolazione dei livelli di ROI, dell'attivazione di altri meccanismi di difesa quali produzione di fitoalessine, proteine PR, PCD, e della produzione di molecole segnale per l'attivazione sistemica della difesa nella pianta quali ossido nitrico, acido salicilico, etilene, acido jasmonico (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Wojtaszek, 1997; Grant e Loake, 2000; Mittler, 2000; Arora *et al.*, 2002; Gozzo, 2003; Foyer e Noctor, 2005).

Meccanismi di difesa della vite

Nelle piante della famiglia delle Vitaceae la più frequentemente osservata e meglio caratterizzata reazione di difesa alle infezioni fungine è l'accumulo di fitoalessine. Le fitoalessine della vite hanno attratto molta attenzione negli ultimi 10 anni sia nel campo della fitopatologia per la loro potenziale attività antifungina, che nel campo della salute umana per le loro capacità antiossidanti e quindi ad attività cardioprotettiva e chemiopreventiva (Soleas *et al.*, 1997; Cichewicz e Kouzi, 2002; Jeandet *et al.*, 2002).

Le fitoalessine prodotte dalle Vitaceae, come anche da alcune altre famiglie di piante, sono principalmente derivati stilbenici. Esse sono accumulate in risposta sia ad attacchi dei patogeni che a stress generici, tant'è vero che sono chiamati anche metaboliti da stress (Cichewicz e Kouzi, 2002), inoltre sembra che siano composti costitutivamente presenti nel legno, mentre nelle foglie e parti verdi la sintesi sia indotta (Soleas *et al.*, 1997; Borie *et al.*,

2004). La molecola capostipite di questo gruppo di fitoalessine è il resveratrolo (*trans*-3,4',5-triidrossistilbene) prodotto nella via metabolica dei fenilpropanoidi, la stessa che da origine ai monomeri della lignina e flavonoidi (Dixon e Paiva, 1995). La sintesi del resveratrolo dipende da una singola chiave enzimatica conosciuta come stilbene sintetasi o resveratrolo sintetasi, la stilbene sintetasi catalizza la formazione del resveratrolo attraverso la condensazione di una molecola di *p*-cumaroil-CoA e tre molecole di malonil-CoA, entrambi metaboliti ubiquitari intermedi della pianta (Cichewicz e Kouzi, 2002) (Fig. 1.2). Il resveratrolo è il componente stilbenico principalmente presente nei tessuti legnosi dei tralci di vite e tale composto è il precursore biosintetico degli altri stilbeni fitoalessinici della vite chiamati viniferine, che sono suoi oligomeri derivanti da un diverso assemblaggio del monomero. Il processo biosintetico che porta alla formazione degli oligomeri del resveratrolo è stato ipotizzato da numerosi autori (Kindl, 1985; Gorham, 1995; Cichewicz e Kouzi, 2002; Jeandet *et al.*, 2002), in generale gli oligomeri del resveratrolo sono ritenuti essere i prodotti di una serie successiva di accoppiamenti ossidativi di radicali del resveratrolo formati ad opera di perossidasi (Fig. 1.3), ed è probabile che proteine accessorie siano implicate nella biosintesi di questi composti come è ipotizzato accada nell'accoppiamento dei monolignoli nella biosintesi della lignina (Davin, 1997; Cichewicz e Kouzi, 2002). Queste proteine sono ritenute capaci di catturare i substrati sotto forma di radicali permettendo un accoppiamento che produce un prodotto otticamente attivo. Anche gran parte degli oligomeri del resveratrolo mostrano attività ottica. Alcune delle viniferine conosciute sono state isolate dalle piante sotto forma di piceidi, cioè glicosilate (Soleas *et al.*, 1997; Cichewicz e Kouzi, 2002).

Molti fattori sono capaci di indurre la sintesi del resveratrolo nelle piante per regolazione della stilbene sintetasi. Alcuni di questi fattori di induzione sono: irradiazione ultravioletta, stimoli chimici, metalli pesanti, detergenti, ferite, danni meccanici ed attacchi microbici con patogeni (Langcake e Pryce, 1976; Langcake e Pryce, 1977; Jeandet *et al.*, 2002; Borie *et al.*, 2004). Per esempio, quando le *Vitis* spp. sono inoculate con il patogeno *Botrytis cinerea*, le piante rispondono immediatamente con una regolazione localizzata della stilbene sintetasi con conseguente accumulo di resveratrolo e suoi oligomeri nel sito di inoculazione (Cichewicz e Kouzi, 2002). Inoltre altri studi hanno dimostrato l'induzione sistemica di questi composti in parti distali dal sito di infezione (Langcake e McCarty, 1979).

La sintesi indotta di fitoalessine stilbeniche è localizzata per le foglie nelle cellule del tessuto compreso fra l'epidermide e l'anello dei fasci conduttori, e per le bacche nella buccia. E' stato anche verificato che la capacità di sintesi del resveratrolo da parte della buccia

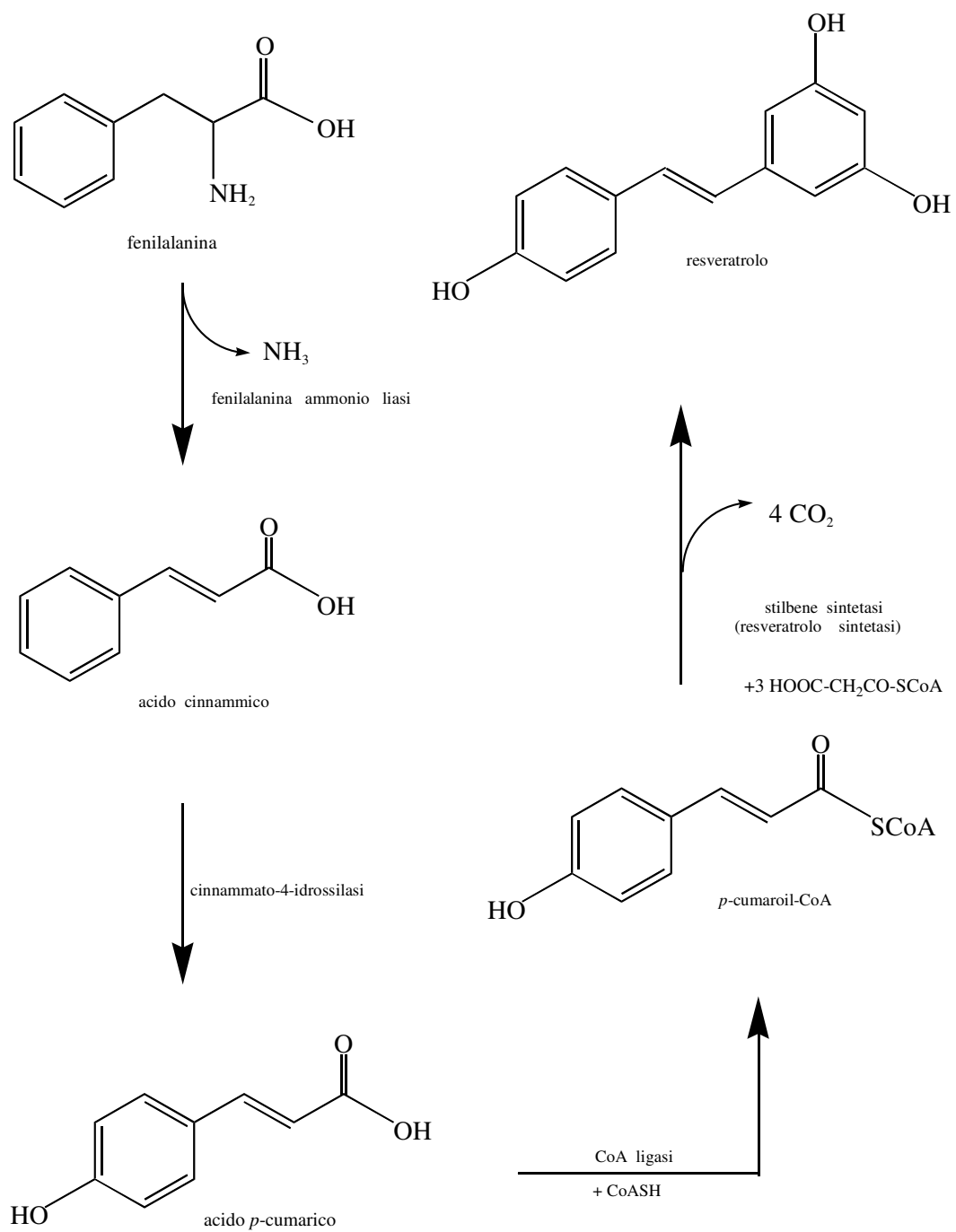


Fig.1.2. Biosintesi del resveratrolo

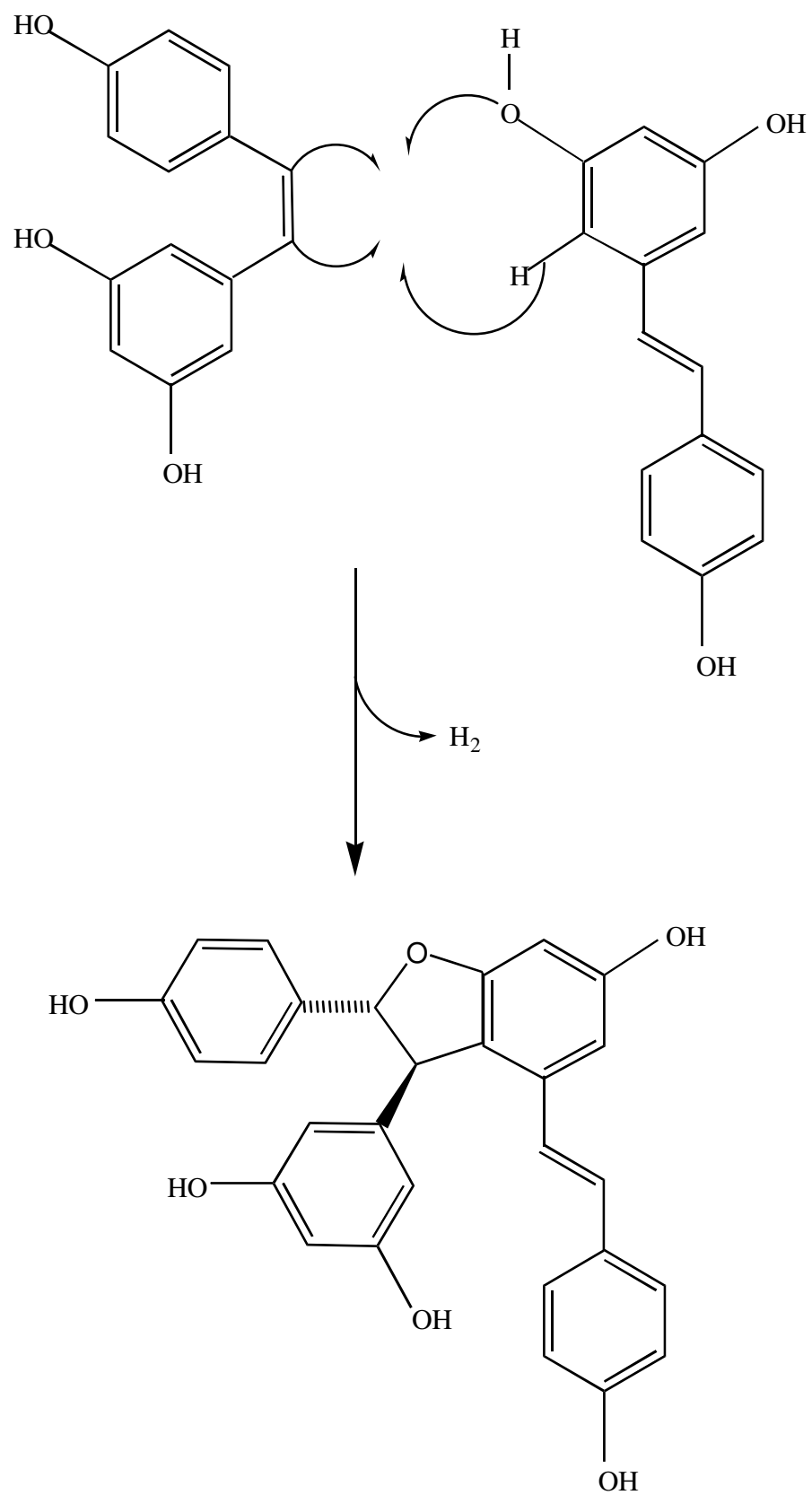


Fig. 1.3 Schema proposto per la dimerizzazione del resveratrolo a ϵ -viniferina

dell'acino è inversamente correlata alla maturazione e che il resveratrolo non è presente negli acini direttamente aggrediti dal patogeno, ma si ritrova in particolar modo in quelli più distanti, dove non è visibile alcun tipo di alterazione (Jeandet *et al.*, 1991). La marcata sintesi di fitoalessine nei tessuti apparentemente sani è determinata, probabilmente, dalla produzione di elicitori con cui la vite segnala la presenza del fungo all'interno di alcuni tessuti e di conseguenza stimola la produzione del resveratrolo anche nelle zone lontane dall'infezione. Se la vite subisce un attacco da parte di *Botrytis cinerea*, sembra che i geni coinvolti nella produzione delle fitoalessine siano capaci di attivarsi per tempo, bloccando lo sviluppo del fungo (Jeandet *et al.*, 1991). Va sottolineato che la vite risponde con la produzione di fitoalessine nella fase iniziale di invasione da parte del patogeno, quando l'abilità di quest'ultimo nel degradare il resveratrolo è molto limitata (Jeandet *et al.*, 1991). Comunque la resistenza della vite ai patogeni coinvolge svariate fitoalessine stilbeniche e non solo il resveratrolo.

Sebbene si ritenga che il resveratrolo giochi un ruolo difensivo vitale nelle piante, esso ha mostrato *in vitro* modeste proprietà antimicrobiche mettendo in discussione la sua denominazione di fitoalessina secondo la definizione classica (Langcake e Pryce, 1976; Cichewicz e Kouzi, 2002; Jeandet *et al.*, 2002). In ogni caso è stata dimostrata la relazione positiva esistente tra capacità di accumulo di fitoalessine stilbeniche e resistenza a patogeni (Soleas *et al.*, 1997; Gottstein e Gross, 1992; Jeandet *et al.*, 2002). Inoltre alcuni metaboliti oligomeri del resveratrolo, come pterostilbene ed ϵ -viniferina, sono noti esibire una maggiore attività antimicrobica (Langcake e Pryce, 1976; Langcake *et al.*, 1979; Langcake, 1981; Gottstein e Gross, 1992; Jeandet *et al.*, 2002). Lo pterostilbene (*trans*-3,5-dimetossi-4'-idrossistilbene) ha mostrato una spiccata attività di inibizione alla crescita di *Phaeomoniella chlamydospora* (Mazzullo *et al.*, 2000).

Non va dimenticato che la vite produce costitutivamente alti composti fenolici come flavonoidi e tannini e anch'essi possono avere azione antimicrobica.

Alcuni autori hanno osservato *in vitro* che in cellule di vite, durante la risposta di ipersensibilità elicitata artificialmente, c'è accumulo di resveratrolo ed altri polifenoli ed H₂O₂ e concomitantemente comparsa di imbrunimenti (Calderon *et al.*, 1993).

Anche le proteine PR svolgono un ruolo importante nella difesa della vite. Alcuni studi hanno dimostrato la potenziale implicazione della chitinasi e della β -1,3-glucanasi nella resistenza o tolleranza di alcune specie di *Vitis* nei confronti dell'oidio (*Uncinula necator*) e di *Botrytis cinerea* (Jacob *et al.*, 1999; Jeandet *et al.*, 2002).

Nelle aree infette bruno-rosse del legno di viti affette da mal dell'esca è stata dimostrato l'accumulo di resveratrolo ed ϵ -viniferina (Amalfitano *et al.*, 2000). Inoltre da analisi istochimiche e microscopiche condotte su legni infettati dai patogeni dell'esca si è riscontrato accumulo di sostanze fenoliche nelle pareti cellulari dei vasi infetti e delle cellule adiacenti e formazione di tillo dalle cellule parenchimali associate allo xilema le quali invadono il lume delle cellule xilematiche infette occludendole (Del Rio *et al.*, 2001; Troccoli *et al.*, 2001).

Obiettivi della tesi

Vista la scarsa chiarezza dell'eziologia dell'esca e la necessità di approntare strategie di difesa dei vigneti con metodi da auspicarsi ecocompatibili, risultano di particolare interesse studi di base sui meccanismi di interazione ospite-patogeno e sulla fisiologia di risposta della pianta. Inoltre vista la longevità dei vigneti affetti da mal dell'esca, fra l'altro con produttività accettabili, anche studi sulla possibilità di contenimento dei sintomi possono essere utili. Sono quindi stati condotti studi sulla risposta della pianta all'infezione in termini di produzione di fitoalessine e loro azione nella pianta, sulle alterazioni del legno operate dai funghi patogeni dell'esca e sull'influenza delle concimazioni fogliari sullo sviluppo dei sintomi fogliari e sulla qualità delle uve.

2. MATERIALI E METODI

Isolamento delle fitoalessine

Tutti i solventi utilizzati di grado analitico o per HPLC sono stati forniti dalla Carlo Erba. L'acqua deionizzata utilizzata per le eluizioni cromatografiche e le soluzioni è stata ottenuta da un sistema Milli-Q della Millipore.

Per l'isolamento delle viniferine dal legno è stato ottenuto un estratto metanolico da una porzione sintomatica di un tronco di *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affetta da mal dell'esca cresciuta in Toscana. Il tronco è stato scortecciato, ridotto in scaglie, quindi macinato in azoto liquido come in un precedente lavoro (Amalfitano *et al.*, 2000) ottenendo 334.0 g di polvere che è stata estratta nel rapporto di 4.5 ml g⁻¹ di legno per 24 h per una volta con etere di petrolio e per tre volte con metanolo riusando il solvente recuperato per evaporazione. Sono stati ottenuti 13.5 g di estratto metanolico, una sua aliquota, circa 1 g, è stata ridisciolta in 2.5 ml di metanolo, filtrata su filtri monouso da 0.45 µm (Anotop, Watman) e frazionata in alcuni dei suoi componenti principali con HPLC (pompe modello 422, detector UV-Vis a due canali mod. 433, software PC Integration Pack, Kontron) su colonna semipreparativa a fase inversa (LiCrospher 100 RP-18, 250 x 10 mm i.d., con particelle da 10 µm, Merk) munita di filtro da 2 µm (Alltech) per ripetute iniezioni fra 20 e 50 µl della miscela, raccogliendo l'eluato con un collettore automatico (HeliRac 2212 LKB, Bromma). L'eluizione dell'estratto metanolico del legno è stata eseguita al flusso di 5 ml min⁻¹ in gradienti lineari di concentrazione H₂O/CH₃CN partendo da CH₃CN al 20% fino al 33% in 90 min, quindi per riequilibrare la colonna prima di una successiva iniezione riportata la percentuale al 20% in 5 min a cui sono seguiti altri 5 min di eluizione in condizioni isocratiche. Per l'individuazione dei picchi cromatografici di eluizione si è tenuto conto dei segnali derivanti dall'assorbimento a 210 nm. Le frazioni omogenee, in riferimento ai tempi di eluizione dei picchi del cromatogramma, sono state raggruppate, in parte svaporate al Rotavapor (Heidolph) alla temperatura di circa 35 °C, poi congelate e liofilizzate. Ciascun liofilo è stato poi ridisciolto nella minima quantità di metanolo e reiniettato al cromatografo (20-50 µl) per raccogliere frazioni contenenti i componenti della miscela ad un maggiore grado di purezza. Le operazioni anzidette sono state reiterate fino all'ottenimento di quantità delle sostanze da identificare non inferiori ai 2 mg ad elevato grado di purezza per la loro identificazione con metodi spettroscopici, per l'utilizzo

come standard per l'analisi quantitativa all'HPLC delle miscele metanoliche estratte e per sottoporle a reazione di Fenton.

Gli spettri monodimensionali (^1H e ^{13}C) e bidimensionali (COSY and HSQC) NMR sono stati eseguiti su uno strumento Bruker a 400 MHz per il protone, in soluzione di CD_3OD e/o $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Gli spettri di massa ES-MS in ioni positivi e negativi sono stati ottenuti con uno strumento ES-MS API 100 LC-MS Perkin Elmer. Il potere rotatorio è stato misurato su un polarimetro P-1010, JASCO.

Analisi HPLC degli estratti metanolici dei legni

I trucioli di legno bruno-rosso e di legno asintomatico dalla stessa pianta malata, sui quali sono state eseguite le determinazioni dei contenuti di viniferine, sono gli stessi (*Vitis vinifera* cv. Sangiovese, pianta B) di un precedente lavoro (Amalfitano *et al.*, 2000) e sono stati ottenuti sezionando il tronco longitudinalmente e recidendo minuziosamente con l'aiuto di uno scalpello piccoli pezzi di legno bruno-rosso e legno asintomatico. I trucioli, circa 0.5 g, sono stati polverizzati (Amalfitano *et al.*, 2000) e quindi estratti in etere di petrolio in soxhlet per 8 h, il residuo estratto con 10 ml di metanolo al riparo dalla luce diretta sotto agitazione per 4 ore a temperatura ambiente e quindi con altrettanto solvente fresco per tutta la notte. Gli estratti metanolici sono stati quindi riuniti e portati a secco con Rotavapor alla temperatura di circa 35 °C ottenendo una resa dell'estratto organico pari a 6.92% e 5.57% del legno bruno-rosso e asintomatico, rispettivamente.

Per l'analisi HPLC sono stati usati come standard: il *trans*-resveratrolo, acquistato dalla SIGMA-ALDRICH; il *cis*-resveratrolo, ottenuto dal *trans*-resveratrolo per isomerizzazione indotta da irraggiamento UV a 365 nm per 3 ore (Trela e Waterhouse, 1996); le viniferine, ottenute dalla purificazione dell'estratto organico del legno sintomatico; lo pterostilbene (3,5-dimetossi-4'-idrossistilbene), ottenuto per sintesi secondo il metodo di Massarini (1957), con alcune modifiche, a partire dall'acido 3,5-dimetossifenilacetico (Merck) e dalla *p*-idrossibenzaldeide (Merck) e successiva purificazione per TLC preparativa (SiO_2 Kieselgel 60 F₂₅₄ da 0.5 mm, Merck). Le rese dello pterostilbene ottenuto sono state del 75% di composto puro identificato per analisi ES-MS e ^1H NMR (Dawidar *et al.*, 1994).

L'analisi quali-quantitativa delle viniferine negli estratti metanolici dei legni asintomatico e bruno-rosso è stata condotta in HPLC con colonna analitica (LiCrospher 100 RP-18, 250 x 4 mm i.d., con particelle da 5 μm , Merck) con lo stesso metodo di eluizione usato con la colonna semi-preparativa ma a 1 ml/min e detector settato alle lunghezze d'onda

di 290 e 210 nm. Per l'analisi dello pterostilbene è stato usato un flusso di 1 ml/min in gradiente H₂O/CH₃CN da CH₃CN al 20% fino al 50% in 50 min, quindi al 20% in 5 min, e prima della successiva eluizione 10 min in isocratica. In tali condizioni il tempo di eluizione dello pterostilbene era 47.5 min. L'analisi qualitativa è stata eseguita per confronto dei tempi di ritenzione medi dei picchi cromatografici di due iniezioni dell'estratto metanolico con quelli degli standard e per co-iniezione con gli standard stessi. La variazione osservata dei tempi di ritenzione dei metaboliti identificati non è mai stata superiore a 1 min. Per le rette di taratura per l'analisi quantitativa sono state usate le soluzioni metanoliche degli standard a concentrazioni note. Come standard di *cis* e *trans*- ϵ -viniferina è stata usata una miscela delle due in CD₃OD di cui era nota la concentrazione di ciascuna determinata per integrazione dei picchi distintivi di esse all'¹H NMR. Le rette di taratura sono state ricavate per iniezione da un minimo di tre a un massimo di cinque concentrazioni diverse degli standard ottenendo rette con coefficienti di correlazione R² non inferiori a 0.9935 (Tabella 2.1). L'integrazione dei picchi degli standard è stata effettuata sui cromatogrammi registrati a 290 nm per il *trans*-resveratrolo e l'ampelopsina B, e a 210 nm per le altre viniferine.

Tabella 2.1. Rette di taratura per la determinazione HPLC dei metaboliti estratti dai legni

y= mx + n (y: area del picco cromatografico; x: µg del metabolita)							
Metabolita	N° punti	Interv. linearità (µg)	m	n	SDy	R ²	*LOD µg
α -viniferina	3	0,0780-0,780	46,1	-0,97	0,259	0,9999	0,016
<i>trans</i> - ϵ -viniferina	3	0,0820-2,89	66,4	2,18	0,434	0,9999	0,0097
<i>cis</i> - ϵ - viniferina	3	0,0650-1,13	105,8	-1,24	5,273	0,9962	0,065
pallidolo	4	0,0760-0,765	61,1	1,02	0,675	0,9991	0,019
opeafenolo	3	0,150-3,30	51,7	4,12	4,406	0,9986	0,11
isoopeafenolo	5	0,0630-4,20	54	6,08	5,295	0,9974	0,056
** <i>trans</i> -resveratrolo	5	0,0805-1,61	82,7	0,49	1,411	0,9995	0,030
<i>cis</i> -resveratrolo	4	0,1019-1,0192	43,85	0,21	0,5294	0,9994	0,024
ampelopsina A	5	0,180-2,16	92,2	-4,88	7,598	0,9935	0,17
**ampelopsina B	3	0,270- 2,75	20,6	-2,68	1,346	0,9994	0,20
ampelopsina H	4	0,0712-0,712	29,3	0,70	0,549	0,9970	0,032

*Limite di rilevabilità: LOD = 2SDy/S, dove S è l'area del picco/µg di metabolita al più basso livello del range di linearità.

**Per questi metaboliti le rette sono state ricavate con detector a 290 nm, per i restanti a 210 nm.

Reazione di Fenton

L'acqua deionizzata utilizzata per le soluzioni è stata ottenuta da un sistema Milli-Q della Millipore.

La reazione di Fenton è stata condotta sull'estratto metanolico del legno sintomatico disciogliendo la massima quantità di estratto in 5 ml di acqua tenendo la miscela in agitazione con un agitatore magnetico e al riparo dalla luce. La miscela è stata quindi filtrata con filtri monouso da 0.45 μm . Dalla soluzione sono state prelevate tre aliquote da 1.5 ml ciascuna, una di esse è stata liofilizzata e il residuo pesato per determinare la concentrazione della soluzione (2.07 mg/ml). Le altre due aliquote sono state usate per condurre in duplicato la reazione di Fenton con H_2O_2 e Fe^{2+} . Il reagente Fe^{2+} è stato preparato disciogliendo 5 mmoli di $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Baker) in 50 ml di acqua, quindi la soluzione (pH 5) filtrata su carta (n. 41 Whatman) e titolata in duplicato con una soluzione standard di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Carlo Erba) per determinare la concentrazione in Fe^{2+} risultata essere 0.0837 M, per la reazione di Fenton è stata usata la soluzione diluita (8.37 mM) conservata in atmosfera di He a 4 °C. La soluzione 20.9 mM di H_2O_2 è stata ottenuta per diluizione da quella al 35% (AppliChem). Alle soluzioni acquose dell'estratto metanolico sono stati aggiunti, sotto agitazione con un agitatore magnetico, prima 13 μl di acqua deionizzata, poi 52 μl della soluzione di Fe^{2+} , subito dopo 435 μl della soluzione appena preparata di H_2O_2 (volume finale di reazione 2 ml). Pertanto il rapporto molare $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ era 20.9 e il rapporto $\text{H}_2\text{O}_2/\text{estratto metanolico}$ era 2.93 $\mu\text{moli/mg}$. L'evoluzione della reazione è stata monitorata iniettando 20 μl della soluzione di reazione in HPLC, eluendo con il metodo precedentemente descritto, dopo 15, 115, 215, 315 e 415 min (tempi t_1 , t_2 , t_3 , t_4 e t_5). Al tempo iniziale (t_0) sono stati iniettati 15 μl della soluzione dell'estratto metanolico prima dell'aggiunta dei reagenti della Fenton. Dall'analisi quantitativa dei cromatogrammi è stata calcolata ai vari tempi la conversione delle specie identificate nella miscela, $|\Delta C|/C_0 = |C - C_0|/C_0$ (C_0 e C : concentrazioni a t_0 e t delle viniferine, rispettivamente). L'andamento della conversione rispetto al tempo è stato descritto con la funzione del tipo $|\Delta C|/C_0 = mt/(n+t)$, i parametri m e n sono stati ottimizzati con il software KaleidaGraph 3.6 usando i punti relativi a entrambe le repliche, le funzioni mostravano valori di R non inferiori a 0.9779. Le velocità relative iniziali di conversione sono state ricavate dalle derivate prime delle funzioni calcolate a t_0 .

La reazione di Fenton è stata eseguita anche su quantità più elevate di estratto metanolico, discioglibile in 800 ml d'acqua, per la valutazione della variazione dei pesi

molecolari dei componenti della miscela conseguente alla reazione di Fenton. Dopo filtrazione su filtro di carta n. 41 Whatman la concentrazione dell'estratto metanolico è stata determinata su un volume della soluzione di 5 ml pesandone il residuo dopo essiccazione in Rotavapor, (0.557 mg/ml). La soluzione è stata iniettata all'HPLC per la valutazione dei contenuti iniziali dei metaboliti identificati. Dalla soluzione sono stati prelevati due volumi di 375 ml, su uno di essi è stata condotta la reazione di Fenton, l'altro usato come riferimento. L'aggiunta dei reagenti è stata eseguita nello stesso ordine illustrato prima, raggiungendo lo stesso rapporto $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ e un rapporto di H_2O_2 /estratto metanolico pari a 2.55 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ per un volume finale di reazione di 500 ml. La reazione di conversione delle viniferine è stata ritenuta completata in 24 h e le conversioni dei polifenoli valutate con HPLC. Una aliquota delle soluzioni prima e dopo la reazione di Fenton è stata liofilizzata e sul residuo è stata eseguita in duplicato, su circa 1,5 mg, l'analisi elementare CHNS (EA 1108 Elemental Analyzer, Fisons), ricavando il contenuto dell'ossigeno per differenza, l'errore sulle determinazioni non è mai stato superiore al 5%. La soluzione di reazione e quella di riferimento sono state sottoposte a filtrazione in cella Amicon sotto pressione di N_2 su filtro da 10,000 Dalton (Diaflo Amicon) e il filtrato su filtro da 3,000 Dalton. Le frazioni recuperate dai filtri con acqua e il filtrato sono stati congelati e liofilizzati e quindi i residui pesati. Il recupero delle frazioni è stato del 97% e del 94%, rispettivamente per la soluzione di reazione e quella di riferimento. L'ammontare delle frazioni di diverso peso molecolare è stato calcolato in % sul totale recuperato. Sui liofilizzati della soluzione di reazione prima e dopo reazione di Fenton e su tutte le frazioni di diverso peso molecolare è stata eseguita analisi FT-IR col metodo delle pastiglie di KBr su uno strumento FT-IR Spectrum One, Perkin Elmer.

Sul *trans*-resveratrolo (0.582 mg) disciolto in metanolo è stata condotta la reazione di Fenton per aggiunta di quantità delle soluzioni acquose dei reagenti di Fenton tali da raggiungere un rapporto molare H_2O_2 /resveratrolo di 32 e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ di 21.2, e un volume finale di 1 ml (acqua/metanolo 4/1 V/V). La reazione di Fenton è stata condotta anche su 0.686 mg di ϵ -viniferina (miscela di *cis* e *trans*) disciolta in soluzione acquosa ($\text{H}_2\text{O}_2/\epsilon$ -viniferina 3.7; $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 20.9; volume finale 1 ml). Le reazioni sul resveratrolo e sull' ϵ -viniferina sono state arrestate dopo 1 min dalla fine dell'aggiunta di H_2O_2 ; per il resveratrolo estraendo la miscela di reazione con AcOEt, e quindi immediatamente svaporando l'estratto organico, per l' ϵ -viniferina congelando rapidamente la miscela di reazione in bagno metanolico a circa -50 °C e liofilizzando. Per seguire le caratteristiche dei prodotti e della cinetica della reazione di Fenton è stata condotta la reazione anche su 0.518 mg di ϵ -viniferina

(concentrazioni nella soluzione di reazione: ϵ -viniferina 1.14 mM; Fe^{2+} 0.2 mM; H_2O_2 4.17 mM) e nel tempo sono state prelevate aliquote della soluzione di reazione di circa 40 μl , subito congelate in bagno metanolico, dopo il primo minuto dall'aggiunta di H_2O_2 , in successivi intervalli di circa 1.2 min fino a 12 min, e alcuni ulteriori prelievi in maniera sempre più diradata fino a circa 3 ore di reazione. Tutti i campioni delle miscele di reazione così raccolti sono stati analizzati all'HPLC secondo il metodo di eluizione descritto in precedenza e l'identificazione di alcuni picchi dei cromatogrammi è stata effettuata per co-iniezione delle viniferine standard.

Analisi chimiche e FT-IR dei legni

Sono stati utilizzati gli stessi campioni polverizzati di legno asintomatico (A) e legno bruno-rosso (BR) di vite (cv. Sangiovese) affetta da mal dell'esca degli studi sull'accumulo di fitoalessine, inoltre dalla stessa porzione di legno sono stati minuziosamente recisi in piccoli pezzi, con l'aiuto di uno scalpello, circa 500 mg di legno mostrante striature nere (SN) liofilizzati e successivamente polverizzati in azoto liquido come per gli altri campioni. Le polveri di legno sono state sottoposte ad estrazione soxhlet con etere di petrolio (100 ml per 8 h) per l'estrazione delle sostanze grasse. I residui di legno sono successivamente stati estratti con due aliquote da 10 ml di metanolo al riparo dalla luce e sotto agitazione, per 4 h e overnight, poi filtrati su carta Watman (n° 41) e essiccati sotto vuoto. I residui di A, SN e BR nuovamente ottenuti sono stati estratti con 50 ml di una soluzione di ossalato d'ammonio allo 0.5% a 70-80 °C a ricadere per 12 h per due volte, poi filtrati su carta Watman (n° 41), lavati con acqua calda e seccati sotto vuoto. Gli estratti con ossalato insieme alle acque di lavaggio sono stati dializzati in tubi con cut-off 1000 Dalton (Spectrum). La soluzione contenuta nei tubi da dialisi per il BR è stata estratta con acetato di etile. Le soluzioni acquose interne ai tubi da dialisi di tutti e tre gli estratti con ossalato sono state liofilizzate per recuperare il materiale pectico. I residui di legno ottenuti dall'estrazione in ossalato sono stati idrolizzati per le emicellulose con 100 ml di H_2SO_4 0.05 M all'ebollizione a ricadere per 4 h. Le soluzioni d'idrolisi sono state estratte con acetato di etile e l'estratto organico portato a secco al rotavapor, quindi i residui di legno sono stati recuperati per centrifugazione, lavati con acqua e seccati. I nuovi residui dei legni sono stati sottoposti a idrolisi della cellulosa con H_2SO_4 al 72% per 2 h sotto agitazione, i residui recuperati per filtrazione in un imbuto con setto di vetro sintetizzato, lavati e seccati. Tutti i residui di legno dalle estrazioni ed idrolisi sono stati pesati e la resa degli estratti e di emicellulosa e cellulosa calcolata per perdita di peso dei legni

e dei loro residui, mentre la resa di materiale pectico e ligninico è stata calcolata per pesata diretta. Sulle sostanze pectiche dei legni A, SN e BR, e sugli estratti in acetato di etile delle soluzioni di idrolisi con H_2SO_4 0.05 M, è stata eseguita un'analisi FT-IR col metodo dell'ATR (Attenuate Total Reflection), gli spettri così ottenuti sono stati corretti in spettri in trasmissione utilizzando il software dello strumento.

Analisi NMR ^{13}C CP-MAS dei legni

I campioni di legno e tutti i residui ottenuti da ogni procedura di estrazione ed idrolisi sono stati sottoposti ad analisi NMR ^{13}C CP-MAS. Gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento Bruker AVANCE TM 300 MHz, equipaggiato con un probe Wide Bore MAS 4 mm, operante a 75.475 MHz per il carbonio, e il campione tenuto in rotazione a 13000 ± 2 Hz. I campioni sono stati impaccati in rotore di zirconio di 4 mm di diametro con capsula Kel-F. Sono stati acquisiti 1510 datapoint in un tempo di acquisizione di 20 ms, con un ritardo di riciclo di 3.0 s per scan. Ogni spettro è risultato dall'accumulo di circa 2000 scan. Per tutti gli spettri è stato usato un tempo di contatto di 1 ms e una sequenza di impulsi CP con una rampa 1H per tener conto della disomogeneità della condizione di Hartmann-Hahn ad alta velocità di rotazione. L'elaborazione degli spettri è stata eseguita con software Mestre-C versione 4.5.3.0. Tutti i "free induction decays" (FID) sono stati trasformati applicando, prima, uno "zero filling" di 4 K, e dopo, una funzione esponenziale di filtro con una ampiezza di linea (LB) di 50 Hz. Per correggere la linea di base degli spettri è stata usata una correzione manuale multipunto con 14 punti interpolati da una funzione cubica. Per la velocità di rotazione adottata, le side band di rotazione (SSB) non sono state osservate, e così non sono state necessarie né un'elaborazione matematica delle SSB né una sequenza di impulsi per la soppressione totale delle side band (TOSS).

Tutti gli spettri dei legni e dei loro residui sono stati divisi in diverse regioni, in cui le risonanze sono state ascritte a differenti gruppi funzionali e strutturali dei principali costituenti del legno, carboidrati e lignina (Wilson, 1987; Atalla e VanderHart, 1999), considerando come punti di taglio per l'integrazione la valle dei picchi. Tali regioni per i legni e i loro residui, tranne quello ligninico, sono di seguito elencate:

- 196-166 ppm, carbonio carbossilico negli acidi, ammidi ed esteri; tipicamente dovuto ai gruppi acetilici dell'emicellulosa;
- 166-141 ppm, carboni arilici ossigenati, principalmente derivanti da carboni C3 e C4 di unità guaiaciliche e C3 e C5 di unità siringiliche della lignina;

- 141-112 ppm, carboni arilici protonati o C-sostituiti, principalmente della lignina, e carbonio C4 ossigenato di unità siringiliche della lignina;
- 112-94 ppm, principalmente carbonio C1 acetico della cellulosa, e carboni arilici protonati particolarmente schermati, come i carboni C2 e C6 nel siringile;
- 94-79 ppm, carbonio C4 dei carboidrati, principalmente della cellulosa, e carboni sp^3 alcolici ed eteri delle catene laterali della lignina;
- 79-59 ppm, da C2, C3, C5 e C6 dei carboidrati, principalmente della cellulosa, e carboni sp^3 alcolici ed eteri delle catene laterali della lignina;
- 59-52 ppm, OCH_3 e $C\beta-C$ principalmente dalla lignina;
- 52-0 ppm, carboni alchilici totali, tra cui a 21 ppm il gruppo CH_3 acetico principalmente delle emicellulose.

Per il residuo ligninico la suddivisione degli intervalli è stata la seguente (Wilson, 1987; Abe e Yamauchi, 1988; Ralph *et al.*, 2004):

- 196-166 ppm, carbonio carbossilico;
- 166-141 ppm, segnali multipli sovrapposti di carboni arilici ossigenati, tipicamente C3 e C4 del guaiacile e C3 e C5 del siringile;
- 141-97 ppm, carboni arilici protonati o C-sostituiti, incluso il carbonio arilico ossigenato C4 del siringile;
- 97-68 ppm, ($C_{sp^3}O-$) principalmente da carboni $C\alpha-O$ e $C\beta-O$, che formano strutture eterificate, alcoliche e pinoresinolo;
- 68-59 ppm, carbonio $C\gamma$ alcolico delle catene laterali della lignina;
- 59-52 ppm, OCH_3 e $C\beta-C$ delle catene laterali della lignina;
- 52-0 ppm, carboni alchilici e $C\beta-C$ delle catene laterali della lignina.

La valutazione quantitativa delle regioni è stata eseguita secondo l'equazione $(AR/AT)*100$ dove AR è l'area di ogni regione spettrale e AT è l'area totale dello spettro.

Sono stati calcolati anche rapporti tra le aree di gruppi funzionali utili a svolgere confronti fra i materiali analizzati.

Il carbonio carboidratico totale (%) nel legno è stato calcolato come 6/5 dell'area spettrale nell'intervallo 94-59 ppm corrispondente ai segnali dei carboni C2, C3, C4, C5 e C6 dei polisaccaridi, corretta con la sottrazione del contributo nello stesso intervallo di segnali dovuti alla lignina (carboni sp^3 alcolici ed eteri delle catene laterali). Tale contributo è stato calcolato assumendo che il rapporto dell'area dello spettro del rispettivo residuo ligninico

nell'intervallo 94-59 rispetto a quella degli arili nell'intervallo 166-112 ppm, quindi escludendo il contributo dei carboni arilici sovrapposto al C1 dei polisaccaridi, sia lo stesso nello spettro del legno e dei suoi residui, ovvero che il contributo arilico in quell'intervallo sia dovuto solo alla lignina.

Il rapporto cellulosa cristallina su amorfa è stato calcolato dal rapporto percentuale delle aree dei segnali dei carboni C4 a circa 89 ppm e 84 ppm attribuibili alle due forme cellulosiche, rispettivamente, corretti allo stesso modo descritto prima relativamente a questa zona spettrale.

Nel legno gli arili (intervallo 166-94 ppm) sono stati corretti per il contributo del segnale del carbonio C1 carboidratico sottraendo 1/5 dell'area corretta corrispondente ai segnali dei carboni C2, C3, C4, C5 e C6 dei carboidrati.

Nella lignina dei legni asintomatico e con strie nere una stima approssimata del metossile è stata ottenuta sottraendo il contributo di C β -C al segnale a 56 ppm. Tale contributo è stato calcolato assumendo che il C γ sia tutto in forma alcolica (68-59 ppm) e il C α in forma eterea (97-68 ppm), mentre C β nella forma sia di C β -O etereo (97-68 ppm) che di C β -C (59-52 ppm). Per cui il contributo dell'area di C β -C al segnale a 56 ppm diventa: 2 area 68-59 ppm (C γ) – area 97-68 ppm (C α -O + C β -O). In questa valutazione approssimata il metossile potrebbe essere sottostimato poiché è possibile che parte del C β -C risuoni a campi più alti. Invece nella lignina del legno bruno-rosso il metossile è stato calcolato supponendo che il C γ sia rimasto nello stesso rapporto con il C β -C della lignina del legno asintomatico.

Va sottolineato che a causa dei problemi riguardanti la determinazione quantitativa usando il metodo NMR ^{13}C CP-MAS (Wilson, 1987) e l'arbitraria natura della suddivisione dello spettro, i valori ottenuti per vari gruppi strutturali possono essere usati solo per fini comparativi nell'ambito di materiali omogenei in composizione come quelli del presente lavoro.

Concimazioni fogliari

I trattamenti fogliari sono stati eseguiti in due vigneti della cv. “Trebbiano d'Abruzzo” colpiti da esca propria, entrambi di 32 anni di età e situati in Abruzzo, nella Provincia di Teramo, nelle zone vitate di Controguerra e Giulianova. I due vigneti sono condotti con due differenti forme di allevamento: il vigneto di Controguerra, con il sistema di allevamento “Geneva

Double Curtain” (GDC), ed il vigneto di Giulianova, con la forma di allevamento “Tendone”.

I trattamenti a base di concimi fogliari e bioattivatori sono stati effettuati nelle stagioni 2004 e 2005, in ognuno dei due vigneti oggetto di studio, utilizzando due parcelle (trattato e testimone) ognuna composta da uno stesso numero di piante disposte su un medesimo numero di filari (Tabella 2.2).

In entrambi i vigneti sono stati effettuati interventi di concimazione fogliare, con differenti preparati impiegati selettivamente nel corso della stagione vegetativa, considerando le curve di assorbimento nelle fasi fenologiche della vite riportate in letteratura (Fregoni, 1998). I trattamenti sono stati eseguiti con irroratrice ad aeroconvezione tarata per l'erogazione di un volume di 500 l ha⁻¹. Il calendario degli interventi ed i diversi formulati di micro e macro elementi e di bioattivatori sono riportati in Tabella 2.3 mentre le formulazioni dei prodotti utilizzati sono descritte nelle Tabella 2.4 e 2.5. Le fasi fenologiche interessate dai trattamenti sono state descritte in accordo alla classificazione di Lorenz *et al.* (1995). Tali procedure sono state svolte dal gruppo di ricerca del Dott. Calzarano dell'Università di Teramo.

Tabella 2.2. Dettaglio delle parcelle dei vigneti monitorati.

Locazione del vigneto	Parcella	Sistema di allevamento	Numero di filari	Numero totale di viti	Area (m²)
Controguerra	trattata	GDC	8	309	3000
Controguerra	non trattata	GDC	8	309	3000
Giulianova	trattata	Tendone	8	584	5000
Giulianova	non trattata	Tendone	8	584	5000

Tabella 2.3. trattamenti con bioattivatori e nutrienti fogliari distribuiti per aspersione sulla chioma.

DATA		FASE FENOLOGICA	COMPOSTO	DOSE
2004	2005			
mag-21	mag-19	foglie distese	umato di ferro	1 l/ha
mag-28	mag-27	grappoli visibili	15 - 36 -13 umato di microelementi bioattivatore "S"	1 kg/ha 1 kg/ha 0,3 l/ha
mag-31	giu-03	grappoli visibili	umato di ferro	1 l/ha
giu-09	giu-14	bottoni fiorali separati	15 - 36 -13 umato di microelementi bioattivatore "S"	1,5 kg/ha 1,5 kg/ha 0,4 l/ha
giu-22	giu-27	allegagione	23 - 11- 11 umato di microelementi bioattivatore "S"	1,5 kg/ha 1,5 kg/ha 0,4 l/ha
giu-30	lug-04	mignolatura	23 - 11- 11 umato di microelementi bioattivatore "S"	1,5 kg/ha 1,5 kg/ha 0,4 l/ha
lug-09	lug-15	I fase accrescimento acini	12 - 18 - 32 Ca - Mg - B bioattivatore "S"	1,5 kg/ha 1,5 kg/ha 0,4 l/ha
lug-23	lug-29	II fase accrescimento acini	8 - 16 - 50 bioattivatore "S"	1,5 kg/ha 0,4 l/ha
ago-10	ago-16	chiusura grappolo	bioattivatore "S"	0,4 l/ha
ago-19	ago-23	pre-invaiaatura	bioattivatore "S"	0,4 l/ha
ago-30	set-01	post-invaiaatura	bioattivatore "S"	0,4 l/ha

Tabella 2.4. Composizione dei fertilizzanti umati di ferro, umati di microelementi e Ca-Mg-B (% in peso).

	Umato di ferro **	Umato di microelementi **	Soluzioni di Ca-Mg-B
Sostanza organica *	30,0	30,0	
Azoto organico	0,5	0,5	
Umati alcalini	5,0	5,0	
Acido umico	3,5	3,5	
Acido fulvico	2,7	2,7	
Ferro solfato	5,0	5,0	
Acido borico		1,5	0,6
Zinco solfato		0,7	
Manganico solfato		0,9	
Ossido Ca			8,0
Ossido Mg			4,0

* Sostanza organica umificata 90 %

** Rapporto carbonio/azoto 34,8

Tabella 2.5. Composizione dei fertilizzanti fogliari N-P₂O₅-K₂O (% in peso).

	15-36-13	23-11-11	12-18-32	8-16-50
NO ₃ ⁻	5,4	8,4	9,0	8,0
NH ₃	5,4	8,4	3,0	
(NH ₂) ₂ CO	4,2	6,2		
P ₂ O ₅	36,0	11,0	18,0	16,0
K ₂ O	13,0	11,0	32,0	50,0

Analisi chimiche degli acini

Raccolta dei campioni

Il gruppo di ricerca del Dott. Calzarano ha effettuato nel vigneto di Controguerra un campionamento di acini nella parcella trattata ed in quella non trattata; in entrambe le parcelle sono state prelevate uve prive di lesioni da rami asintomatici di viti sintomatiche; inoltre nella parcella non trattata il prelievo degli acini è stato esteso anche a viti sane. Per ogni tipologia di vite (sintomatiche trattate, sintomatiche non trattate e sane) le uve sono state prelevate da 3 gruppi di 6 viti. Da ognuna delle 6 viti di ogni gruppo sono stati prelevati 1 kg di acini, alla maturità di raccolta, dalle ali, punte e porzione centrale dei grappoli privi di sintomi; complessivamente sono stati generati 3 campioni per ogni tipologia di vite ed ogni campione era costituito da 6 kg di prodotto. Ogni campione è stato prima pestato in mortaio e una frazione omogenea pari ad 1 kg, prelevata dal campione fluido tenuto in agitazione, è stata destinata alla determinazione dei macro e microelementi presso i laboratori del Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali nell'ambito dello svolgimento della tesi in oggetto. La frazione rimanente, sulla quale sono state eseguite le altre analisi chimiche di seguito descritte, è stata sottoposta a torchiatura manuale ottenendo la separazione del mosto da bucce e vinaccioli.

Determinazioni dell'acidità totale, del pH, degli zuccheri riduttori e degli acidi organici

Presso i laboratori dell'Università di Teramo sono state determinate l'acidità totale, il pH, gli zuccheri riduttori sul mosto ottenuto da ognuno dei campioni, in accordo con la metodica ufficiale del Regolamento CEE 2676/90, Allegati 13, 24 e 5 rispettivamente. Inoltre è stata eseguita la determinazione degli acidi organici su un'aliquota pari a 10 ml di mosto ottenuto subito dopo la raccolta da ogni campione; le aliquote di mosto dei campioni sono state omogeneizzate con Ultra-Turrax e filtrate su carta da filtro. Il filtrato è stato centrifugato a 6000 rpm per 3 minuti, quindi è stato prelevato 1 ml di surnatante e diluito con 9 ml di H_2SO_4 0.08 M. L'estratto diluito è stato centrifugato per 3 minuti a 6000 rpm e il surnatante analizzato per il contenuto di acidi organici in HPLC (Perkin Elmer Series 200 System) con un rivelatore DAD (Diode Array Detector), impostando due canali a 210 e 220 nm. L'analisi è stata eseguita utilizzando una colonna a scambio ionico Aminex HP87 H Ion Exclusion BIO RAD (300 mm x 7.8 mm), termostata a 55°C, con pre-colonna Cation H Cartridge BIO RAD (30 mm x 4.6 mm) ed usando come fase mobile H_2SO_4 0.08 M ad un flusso di 0.6 ml min^{-1} per una durata dell'eluizione di 22 minuti. Con questo metodo i picchi degli acidi

risultavano essere ben risolti e i loro tempi di ritenzione risultavano pari a 8,83 e 9,70 min rispettivamente per l'acido tartarico e malico. Le analisi sono state effettuate in duplicato, iniettando un volume di 20 µl per ogni singola analisi. Le rette di calibrazione sono state ottenute iniettando 20 µl degli standard a concentrazione nota di acido tartarico e malico in soluzione di H₂SO₄ 0.08 M. Sono stati preparati 5 standard partendo da una concentrazione di 1 mg ml⁻¹ e i successivi per diluizione seriale in rapporto 1:2.

Determinazioni dei macro e microelementi

Ciascun campione di acini pigiati (1 kg) è stato omogeneizzato in Ultra-Turrax; e una frazione di tale omogeneizzato (100 ml) è stata congelata a -18°C, quindi liofilizzata utilizzando un liofilizzatore CHRIST mod. ALPHA 2-4. Le polveri così ottenute sono state macinate con un mulino a palle in agata (PM 200, Retch), quindi essiccate in essiccatore sotto vuoto da pompa a olio. Una aliquota di ciascuna delle polveri essiccate (500 mg) è stata mineralizzata in tubi di teflon richiudibili ermeticamente con una miscela costituita da 7 ml di HNO₃ al 65%, 0.5 ml di HF al 50% e 9.0 ml di H₂O₂ al 35%. La digestione dei campioni è stata eseguita con digestore a microonde opportunamente programmato (ETHOS900, Milestone). Le soluzioni di digestione raffreddate sono state portate a volume in matracci di plastica da 25 ml con acqua Milli Q e conservate in contenitori di polietilene. Le soluzioni sono state quindi analizzate con spettrofotometro di Assorbimento Atomico (AA) a fiamma aria acetilene (Analyst 700, Perkin Elmer), previo opportune diluizioni e usando soluzioni standard dei vari elementi di elevata purezza.

In assorbimento sono stati determinati Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, e Fe ed in emissione K. Il fosforo è stato determinato nelle stesse soluzioni di digestione precedentemente descritte per via colorimetrica con reagente molibdico misurando l'assorbanza delle soluzioni a 525 nm e interpolando i valori di concentrazione con rette di taratura ottenute da soluzioni standard di fosfato di opportuna concentrazione (Murphy e Riley, 1962).

L'analisi elementare dell'azoto è stata condotta su 1-2 mg di polveri, pesate accuratamente su bilancia, utilizzando un Analizzatore Elementare HCNS (EA 1108, Fisons). Tutte le analisi sono state effettuate in duplicato e reso il valore medio.

Monitoraggio dei sintomi fogliari e della mortalità

I due impianti a Controguerra e Giulianova sono stati oggetto di monitoraggio dei sintomi fogliari di esca e della mortalità determinata dalla malattia dal 1994 al 2005 da parte del gruppo di ricerca del Dott. Calzarano. Il monitoraggio è stato effettuato su tutte le viti numerate secondo la loro posizione nei filari scelti per le prove, verificando comparsa ed intensità dei sintomi sulle foglie. In considerazione del fenomeno di remissione dei sintomi fogliari, detto “mascheramento” (Calzarano e Di Marco, 1997; Cesari *et al.*, 2005; Marchi *et al.*, 2006), in ragione del quale viti colpite dalla malattia possono apparire completamente sane esternamente per diversi anni consecutivi, i rilievi dei sintomi fogliari sono stati effettuati per 12 anni consecutivi al fine di poter distinguere con un certo grado di sicurezza le piante effettivamente sane da quelle malate. In questo modo gli effetti dei trattamenti che hanno costituito l’oggetto della sperimentazione sono stati valutati solo sulla frazione di piante sicuramente malate ovvero solo sulle piante che hanno espresso sintomi fogliari in uno o più anni durante i rilievi.

In base a tali rilievi, effettuati ogni anno, le viti sono state classificate secondo lo schema riportato nella Tabella 2.6 che tiene conto di una scala arbitraria di valori suddivisa in classi che esprimono l’estensione dei sintomi sull’apparato epigeo (classi da 1 a 4). Nella medesima tabella figurano le classi relative alla morte delle viti infette, distinguendo le viti colpite da “apoplessia” e passibili di vegetare nuovamente nella stagione seguente (classe 5), da quelle effettivamente morte (classe 6); nella classe 7 infine, sono state classificate le viti per le quali la morte era stata accertata nell’anno precedente e che quindi erano già state registrate nella classe 6.

Il monitoraggio dei sintomi fogliari effettuato nel 2004 e nel 2005 nelle parcelle interessate dai trattamenti ed in quelle di confronto, a maturità di raccolta, dopo aver effettuato i trattamenti nel corso della stagione vegetativa, ha permesso di calcolare l’incidenza percentuale della manifestazione, nelle parcelle a confronto dei due vigneti, rapportando il numero di piante con sintomi visibili al totale delle piante malate presenti nelle parcelle.

L’intensità di espressione in percento è stata calcolata, nelle parcelle a confronto dei due vigneti, ricorrendo all’indice $\sum N \times 100 / (Y \times Z)$ dove $\sum N$ = sommatoria dei valori di intensità di sintomo per pianta; Y = numero di piante osservate (piante malate sintomatiche ed asintomatiche); Z = valore massimo della scala di espressione dei sintomi (McKinney, 1923).

Tabella 2.6. Scala adottata per la classificazione delle viti oggetto di monitoraggio in classi differenti in relazione all'intensità dei sintomi fogliari ed in base agli eventi di apoplessia o di mortalità accertata.

Classi	Valore della classe	Intensità dei sintomi fogliari, apoplessia e mortalità
1	0.5 – 1.5	10 – 30 %
2	2 – 2.5	40 – 50 %
3	3 – 3.5	60 – 70 %
4	4 – 4.5	80 – 100 %
5	5	Apoplessia
6	6	Morte nell'anno del rilievo
7	7	Morte in anni precedenti

Analisi statistica

Nelle parcelle trattate di entrambi i vigneti l'incidenza e l'intensità dei sintomi sono state comparate statisticamente con quelle delle parcelle non trattate.

A tal fine per l'incidenza è stata effettuata una analisi delle frequenze ad una via utilizzando il trattamento come variabile di gruppo e la presenza del sintomo in scala binomiale; i risultati dell'analisi sono stati espressi tramite test χ^2 ed il valore di probabilità ad esso associato.

Analogamente per l'intensità dei sintomi fogliari si è ricorso ad una analisi delle frequenze utilizzando il trattamento come variabile di gruppo, e la presenza del sintomo in scala categorica adottando la scala adoperata per la registrazione dei sintomi; anche in questo caso i risultati dell'analisi sono stati espressi tramite test χ^2 ed il valore di probabilità ad esso associato.

I risultati relativi alle determinazioni analitiche dei diversi parametri della produzione vinificabile delle viti sintomatiche trattate, non trattate e delle viti sane, sono stati verificati statisticamente tramite analisi della varianza e Test di Duncan ($P=0.05$).

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando le procedure SAS versione 8.1 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

3. RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 STUDI CONCERNENTI LA RISPOSTA FITOALESSINICA

Isolamento delle fitoalessine

Studi precedenti (Amalfitano *et al.*, 2000, 2005) avevano permesso l'isolamento dal legno di *Vitis vinifera* c.v. Sangiovese di sette metaboliti fitoalessinici (Fig. 3.1.1) tutti già segnalati nella famiglia delle Vitaceae e prevalentemente isolati da organi di piante diversi dal tronco, in particolare oltre al resveratrolo, i dimeri (+)-ampelopsina B (Ito *et al.*, 1998), mai segnalata in *Vitis vinifera*, (+)-*cis* e *trans*- ϵ -viniferina (Langcake e Pryce, 1977; Kurihara *et al.*, 1990; Bala *et al.*, 2000), e i tetrametri (+)-ampelopsina H (Oshima e Ueno, 1993), per la prima volta isolata in *Vitis vinifera*, (+)-opeafenolo e (-)-isopeafenolo (Ito *et al.*, 1997; Takaya *et al.*, 2002). Le configurazioni assolute delle suddette molecole sono note per tutte, tranne per l'ampelopsina H. Le viniferine isolate sono stereoisomeri tipici delle Vitaceae, enantiomeri di quelle biosintetizzate dalle altre famiglie di piante dalle quali sono state isolate (Takaya *et al.*, 2002).

Durante l'attuale purificazione la (+)-*trans*- ϵ -viniferina è stata sempre ottenuta con impurezze non trascurabili di (+)-*cis*- ϵ -viniferina nonostante le condizioni favorevoli di separazione date da una ampia differenza dei tempi di ritenzione su colonna dei due isomeri ($\Delta t = 7.9$ min), e le reiterate operazioni di purificazione. Ciò fa supporre una isomerizzazione della forma *trans* durante la procedura di isolamento. Fra l'altro, l'estrazione a freddo con metanolo da legni di vite di vario genere condotte a 4 °C e immediata iniezione dell'estratto hanno evidenziato la sola presenza della *trans*- ϵ -viniferina (dati non pubblicati).

Il cromatogramma dell'estratto metanolico del legno presenta pochi altri picchi significativi oltre a quelli dei composti già identificati, tre fra questi (Fig. 3.1.2) corrispondono ai composti identificati come di seguito riportato. Alcuni ulteriori componenti dalla miscela sono stati purificati e in corso di caratterizzazione strutturale e ne è stata già accertata la natura polifenolica.

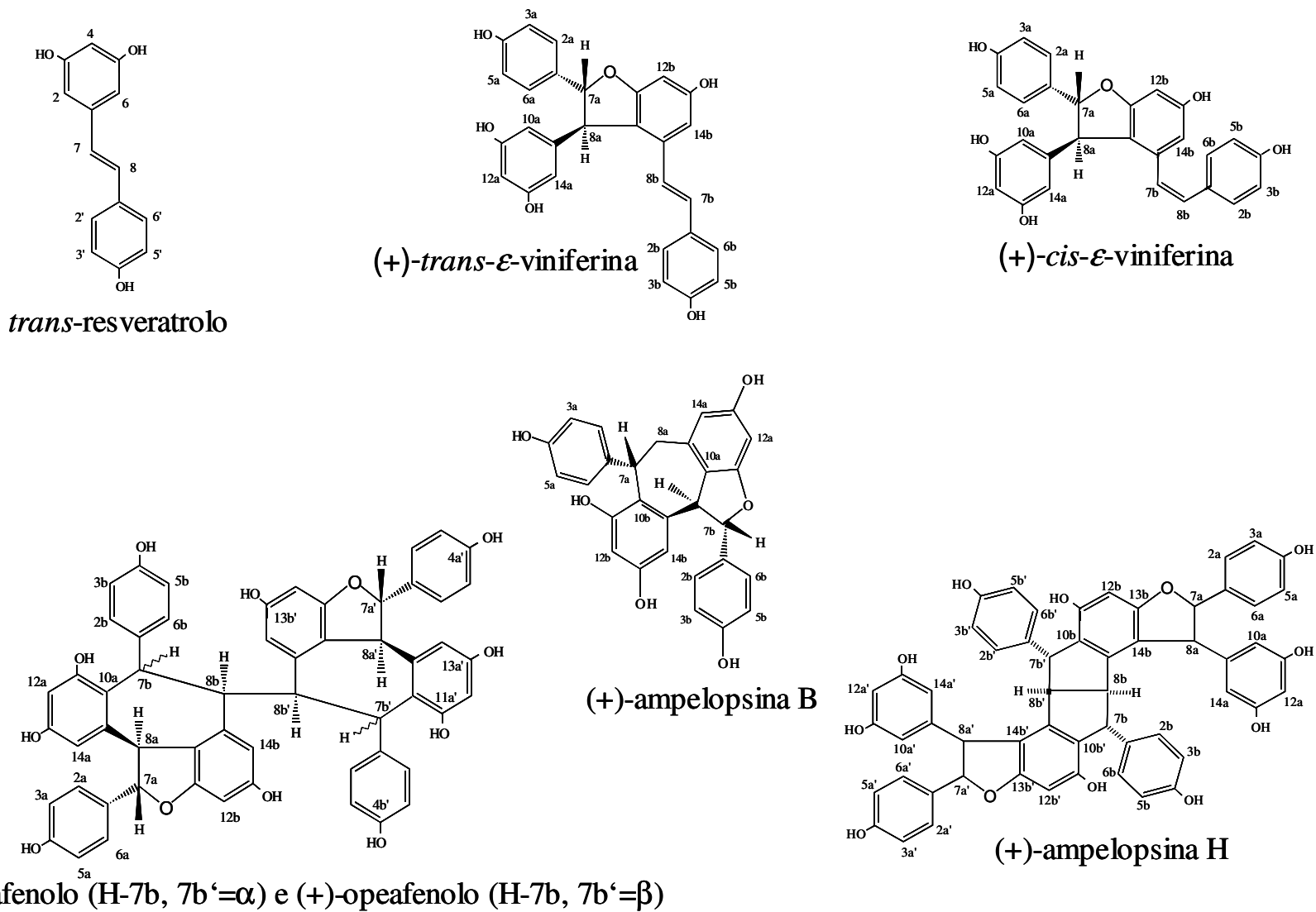


Figura 3.1.1. Metaboliti fitoalessinici estratti dal legno di *Vitis vinifera* cv. Sangiovese.

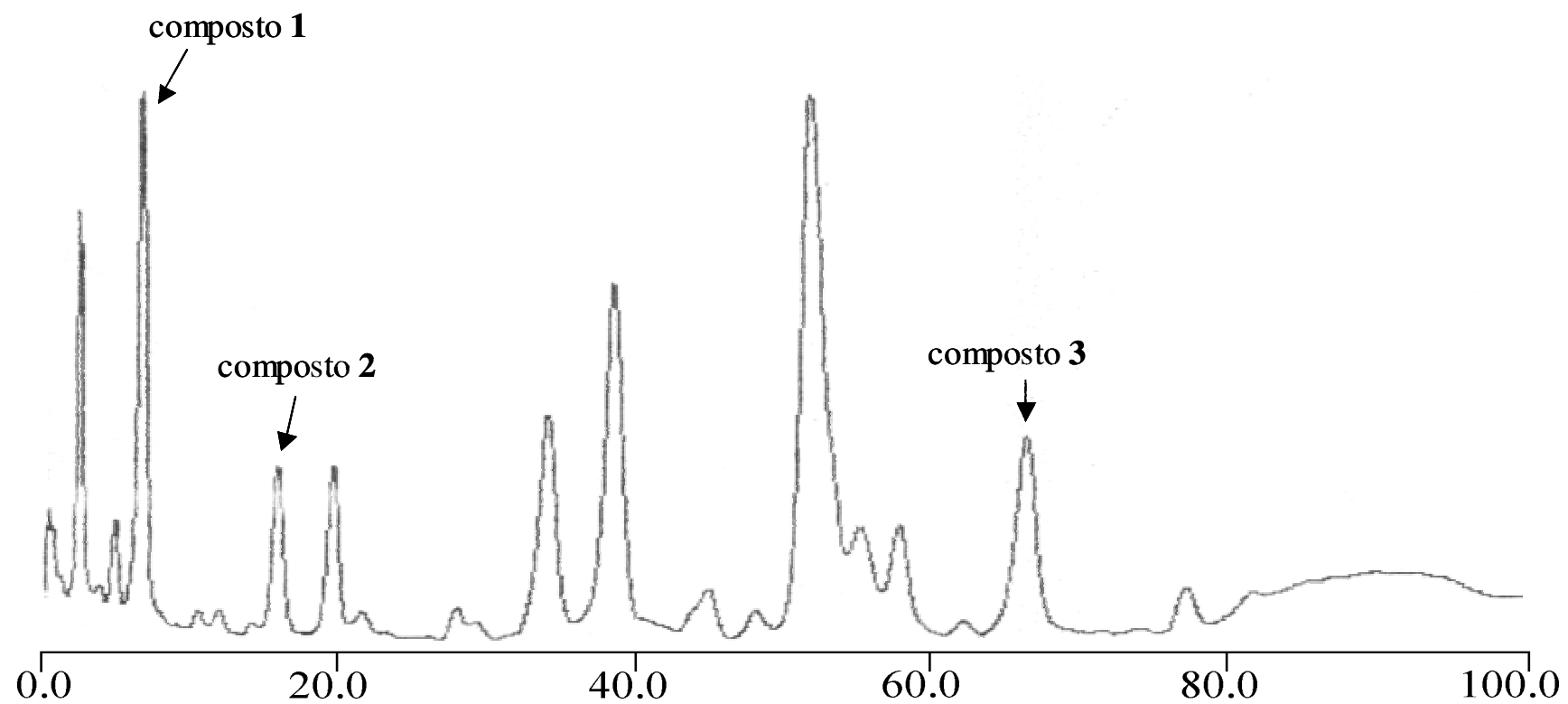


Figura 3.1.2. Cromatogramma su colonna semipreparativa dell'estratto metanolico in cui sono evidenziati i picchi dei tre composti identificati nel presente lavoro.

Identificazione del composto 1

Il composto **1** isolato dall'estratto metanolico del legno sintomatico della *Vitis vinifera* cv. Sangiovese e purificato cromatograficamente, si è presentato come solido amorfo di colore giallastro.

Lo spettro ES-MS del composto **1** ha mostrato in modalità ioni positivi (Fig. 3.1.3) picchi pseudomolecolari poco intensi per $[M+H]^+$ a $m/z = 471.4$, per $[M+Na]^+$ a $m/z = 493.2$ e per $[M+K]^+$ a $m/z = 509.2$; tali spettri suggeriscono un peso molecolare pari a 470 uma; per cui assumendo che tale composto sia un oligomero del resveratrolo, esso corrisponderebbe ad un suo dimero in cui sarebbe presente un ossigeno in più, la cui formula molecolare sarebbe $C_{28}H_{22}O_7$.

Lo spettro 1H NMR del composto **1** (Fig. 3.1.4) mostra una serie di segnali doppietto, aventi area 2, che risuonano nella zona tipica dei protoni legati a carboni aromatici a 7.12, 6.90, 6.78 e 6.64 ppm dotati di $J = 8.5$ Hz; tali segnali sono riconducibili a protoni *orto* accoppiati presenti negli anelli aromatici *para* sostituiti del monomero resveratrolo. Dallo spettro COSY (Fig. 3.1.5) è stato possibile ricavare le loro correlazioni (Tabella 3.1.1) dove si può osservare come il segnale protonico a 7.12 ppm correli con quello a 6.78 ppm e il segnale protonico 6.90 ppm con quello a 6.64 ppm, indicando che tali protoni sono a coppie appartenenti a due anelli *para* sostituiti distinti.

Altri segnali nella zona dei protoni aromatici, di area 1 sono i segnali doppietto a 6.61, 6.44 e 6.15 ppm con $J = 2.1$ Hz e il singoletto slargato a 6.23 ppm. Dallo spettro COSY si osserva come il segnale protonico a 6.61 ppm correli con quello a 6.15 ppm mentre il segnale a 6.44 ppm con quello a 6.23 ppm, indicando che essi rappresentano due coppie di protoni *meta* accoppiati in due distinti sistemi aromatici 1,2,3,5 tetrasostituiti

Sono presenti altri due segnali doppietto di area 1 a 5.76 e 4.16 ppm dotati di $J = 11.4$ Hz, correlati nello spettro COSY, questi due segnali sono ascrivibili ai due protoni sp^3 del gruppo benzodihidrofuranico tipico di molti dimeri del resveratrolo. Gli ultimi due segnali doppietto di area 1 correlanti nel COSY ossia quelli a 5.45 e 5.41 ppm con $J = 4.7$ Hz, rappresentano due protoni particolarmente deschermati legati a due differenti carboni sp^3 ternari vicinali con sostituenti elettron attrattori quali ad esempio ossidrili o fenili.

Lo spettro ^{13}C NMR del composto **1** (Fig. 3.1.6) mostra cinque picchi nella zona in cui risuonano carboni aromatici ossigenati a 159.3, 158.0, 157.6, 156.4 e 155.2 ppm, quello a 158.0 ppm ha un'intensità più elevata. Essi rappresenterebbero il totale dei carboni aromatici ossigenati di un dimero del resveratrolo se il segnale a 158.0 ppm corrisponde a due carboni.

Sono presenti anche altri segnali singoletto, in quanto assenti nello spettro HSQC (Fig. 3.1.7), a 142.3, 139.6, 131.8, 130.1, 118.1 e 117.5 ppm relativi ai carboni quaternari dei monomeri del resveratrolo più altri due segnali di carboni quaternari che deriverebbero dalla giunzione polimerica su carboni aromatici.

Il resto dei segnali a 129.1, 127.9, 115.1, 114.6, 109.6, 104.6, 100.7, 96.2, 87.6, 70.3, 48.7 e 43.1 ppm sono tutti segnali doppietto in quanto nello spettro HSQC (Fig. 3.1.7) correlano con un solo protone, le correlazioni di tali segnali sono riportate nella Tabella 3.1.2.

A questi ventiquattro segnali corrispondono ventotto carboni in quanto quattro di essi più intensi sono segnali relativi a due carboni simmetrici dei due gruppi aromatici *para* sostituiti, come si evince dalle integrazioni dello spettro protonico dei segnali dei protoni cui sono legati, confermando che il composto **1** sia un dimero del resveratrolo. L'ossigeno in più, rispetto ad una normale struttura di dimerizzazione ossidativa del resveratrolo, potrebbe essere di carattere alcolico e quindi legato al carbonio a 70.3 ppm. I dati spettroscopici e la misura di α_D , risultano essere coincidenti con quelli di letteratura relativi alla (+)-ampelopsina A (Fig. 3.1.8), di cui è nota anche la configurazione assoluta (Wen-Wu Li *et al.*, 1995). Pertanto, coerentemente con i dati di letteratura, possono essere senza dubbio attribuiti tutti i segnali NMR ai nuclei del composto **1**, l'ampelopsina A, come riportato nella Tabella 3.1.3.

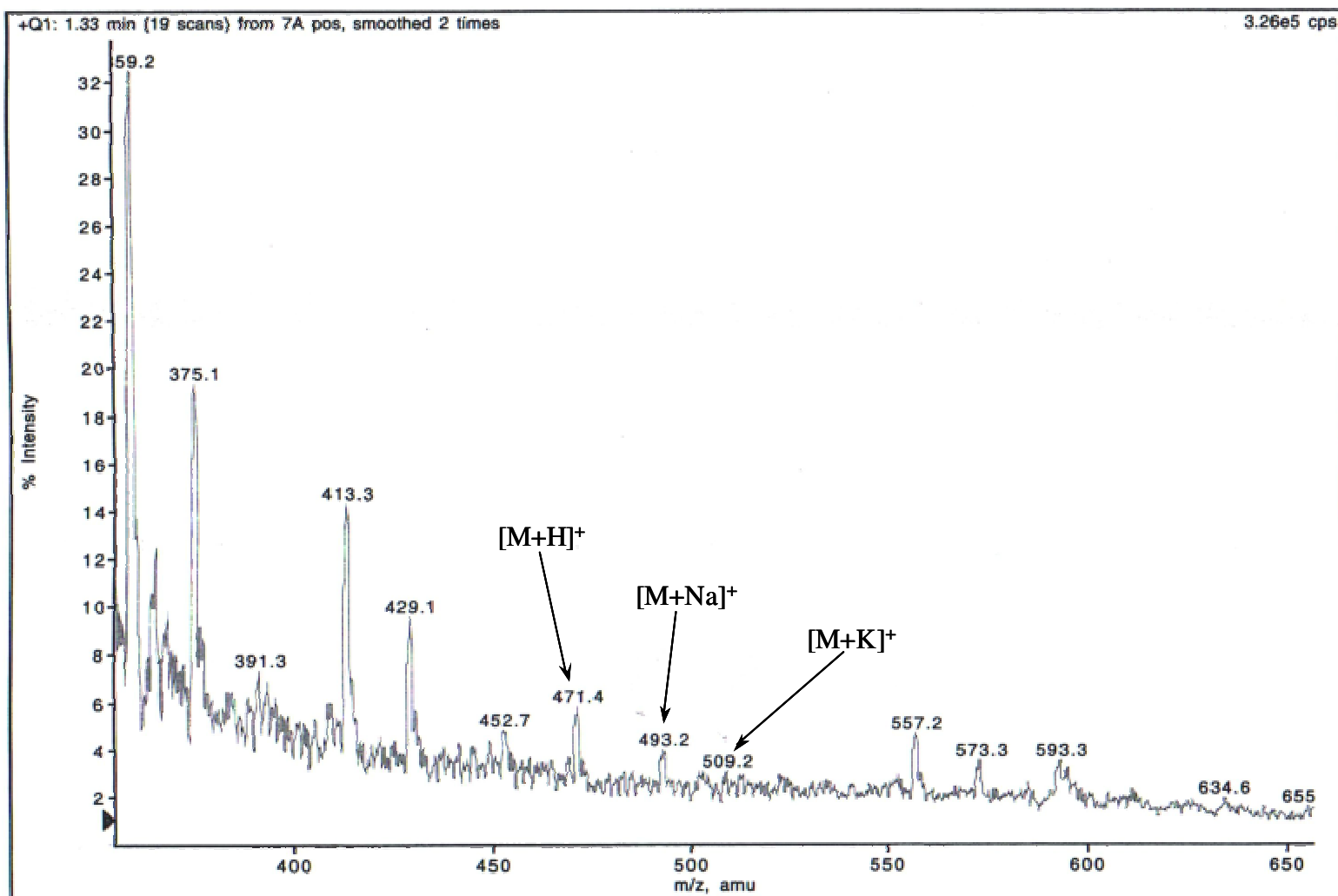


Figura 3.1.3. Spettro ES-MS in modalità ioni positivi del composto **1**.

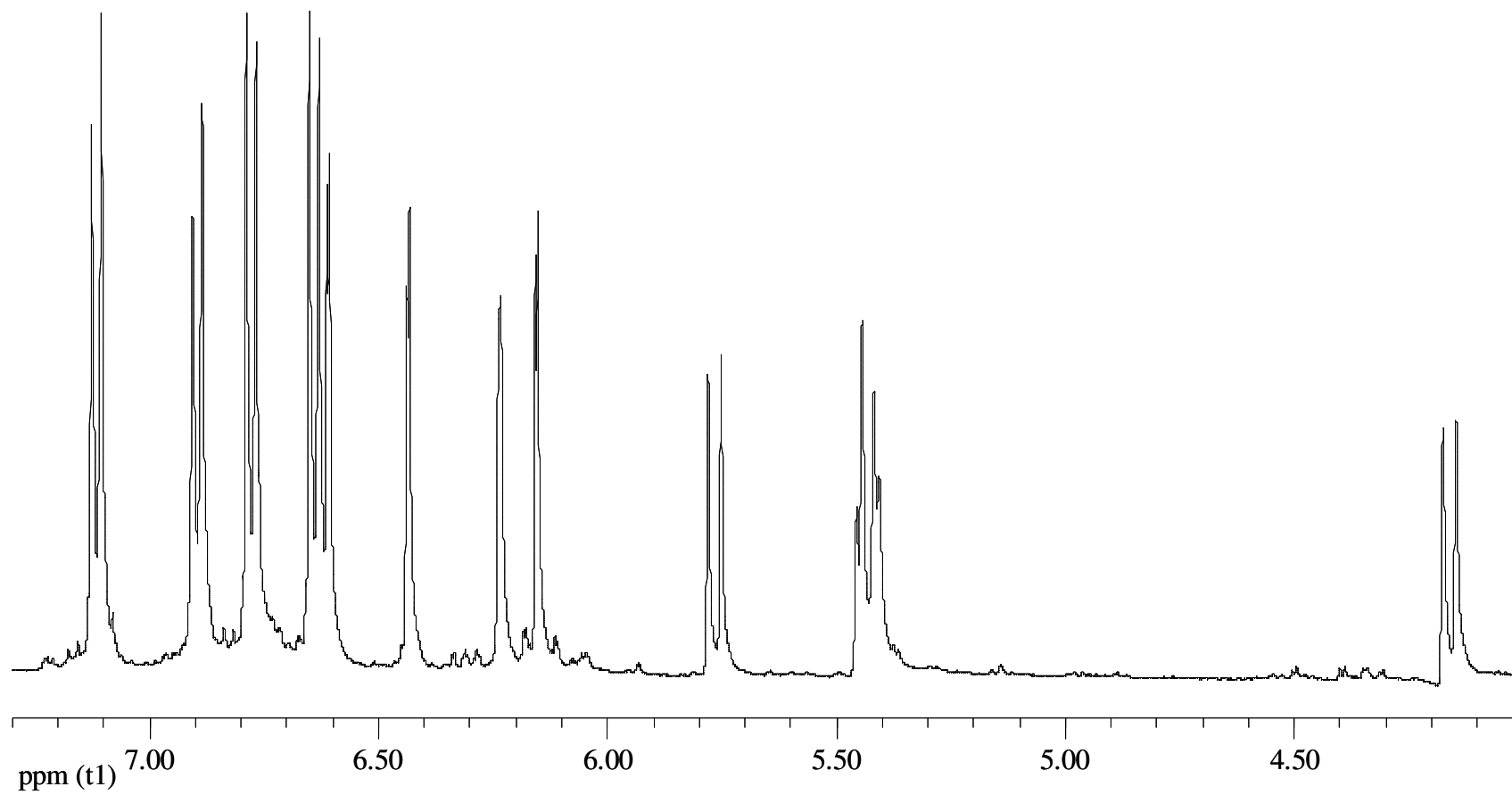


Figura 3.1.4. Spettro ^1H NMR del composto **1** in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

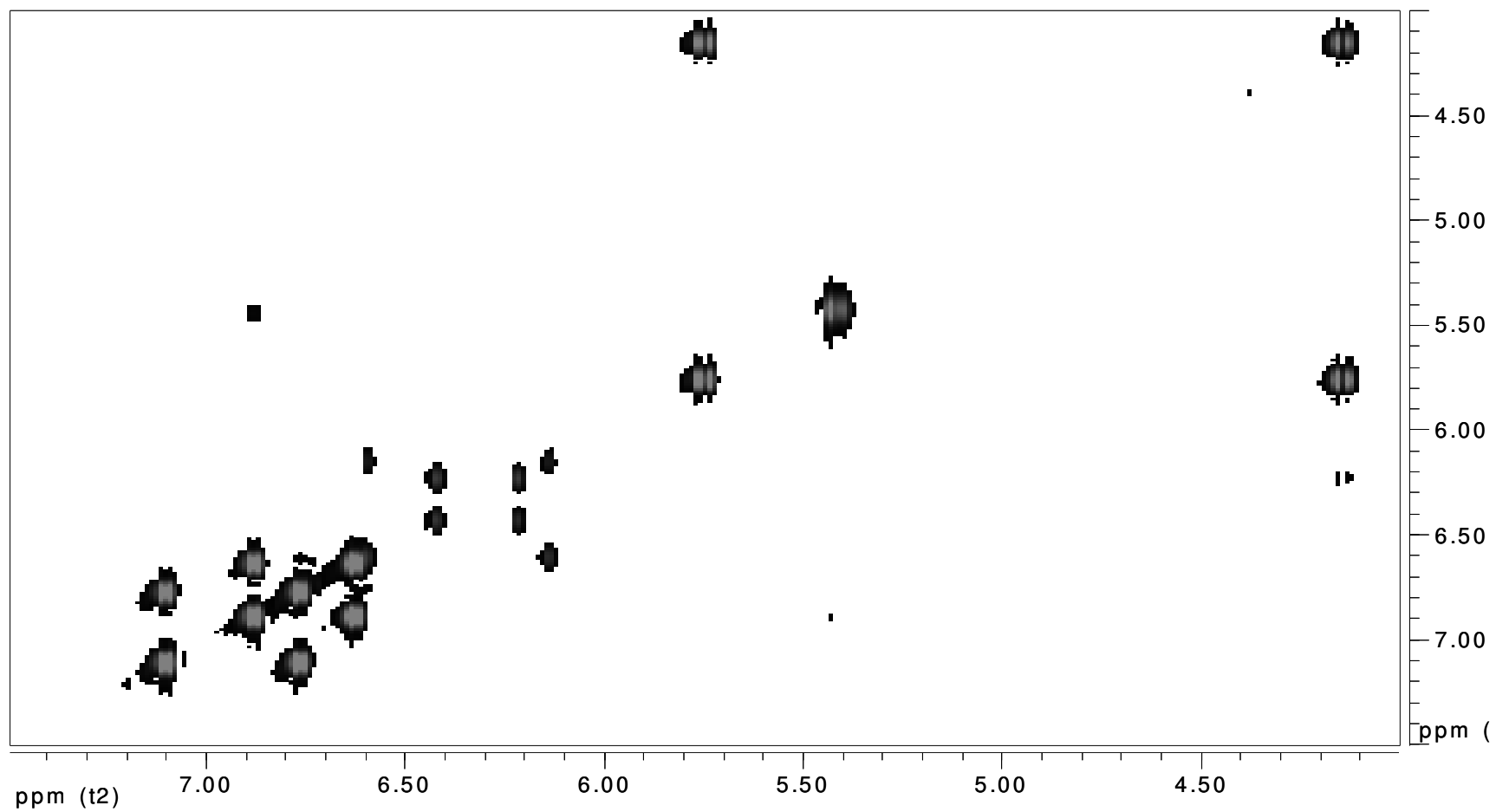


Figura 3.1.5. Spettro COSY del composto **1** in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

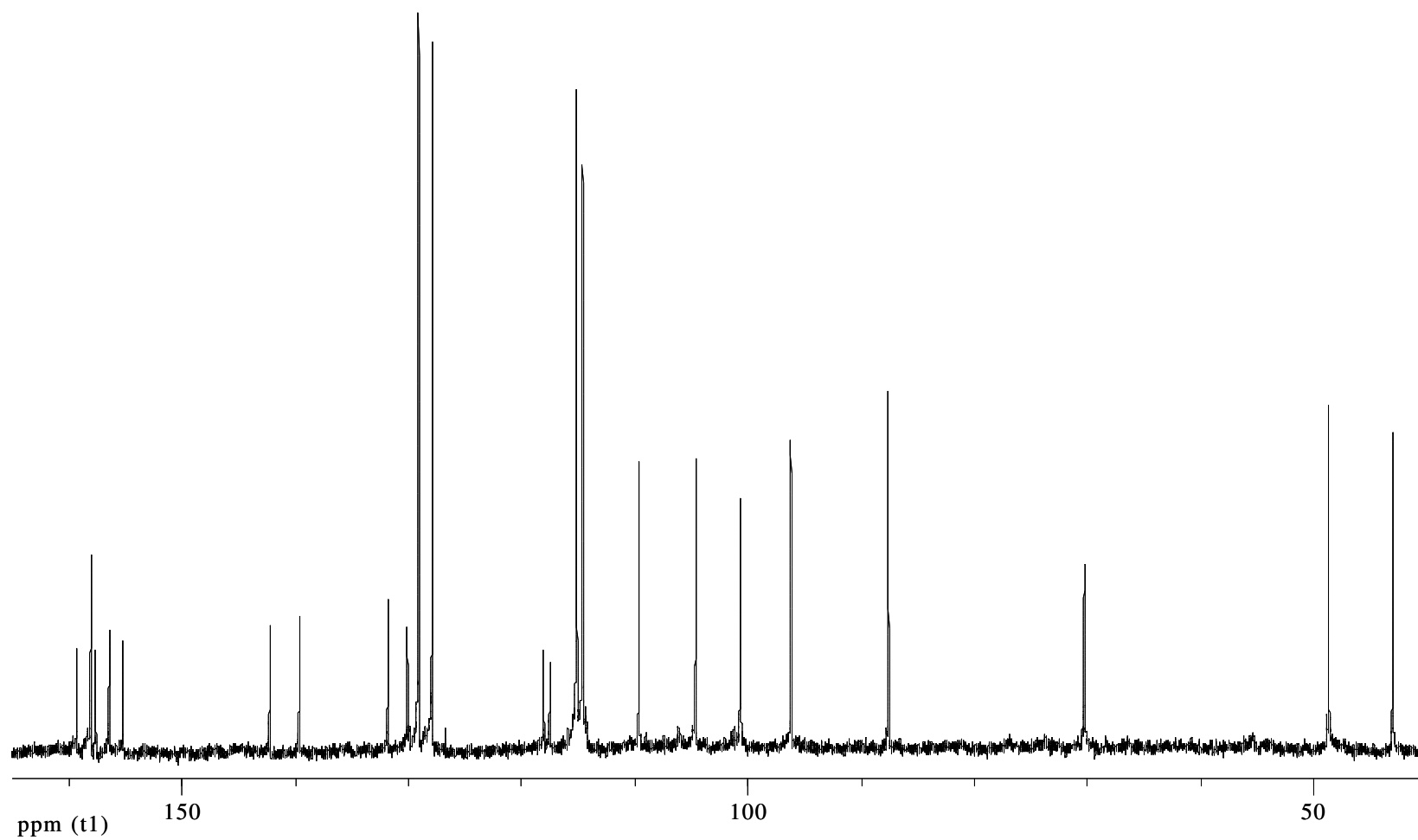


Figura 3.1.6. Spettro ^{13}C NMR del composto **1** in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

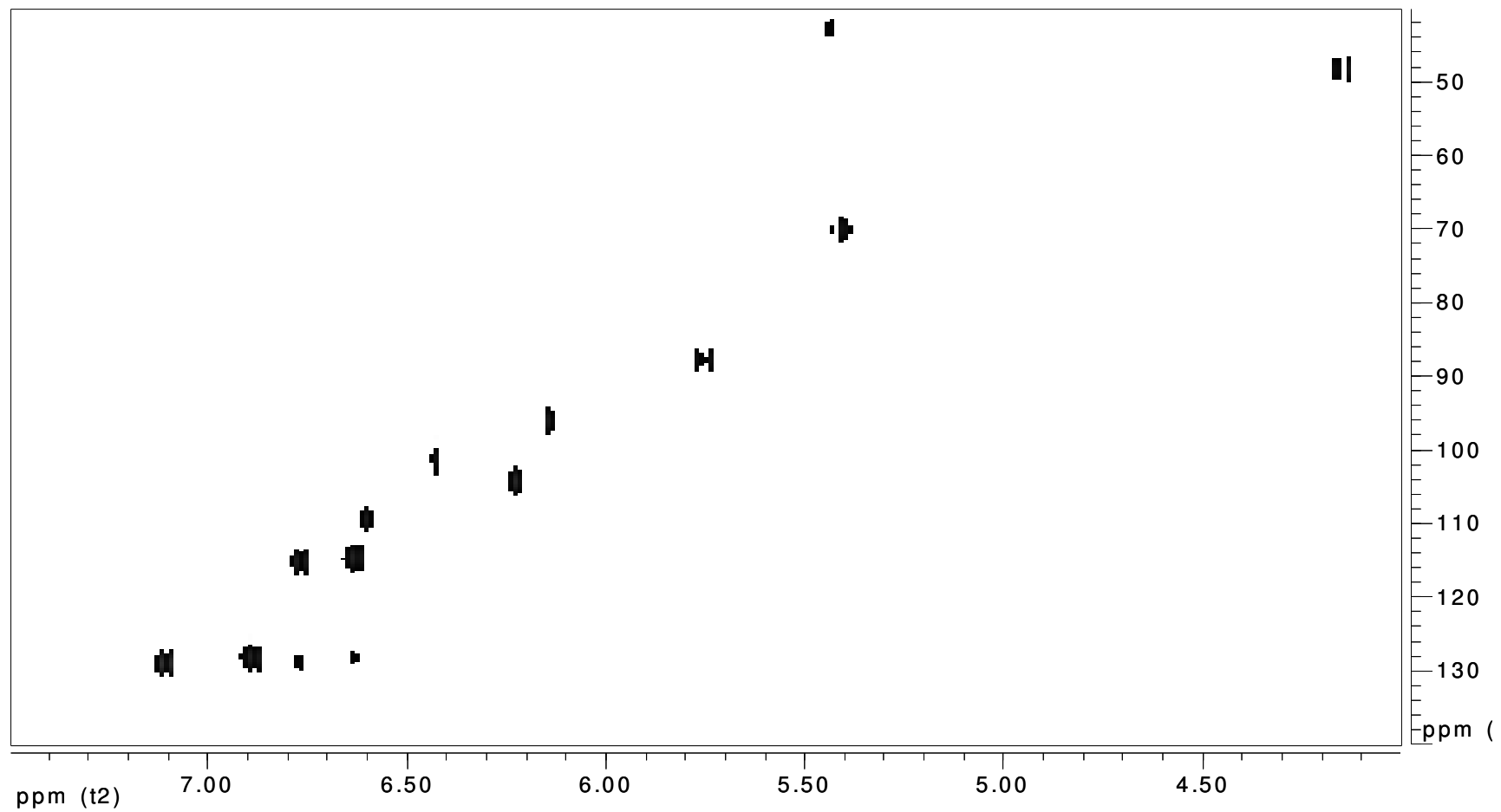


Figura 3.1.7. Spettro HSQC del composto **1** in (CD₃)₂CO.

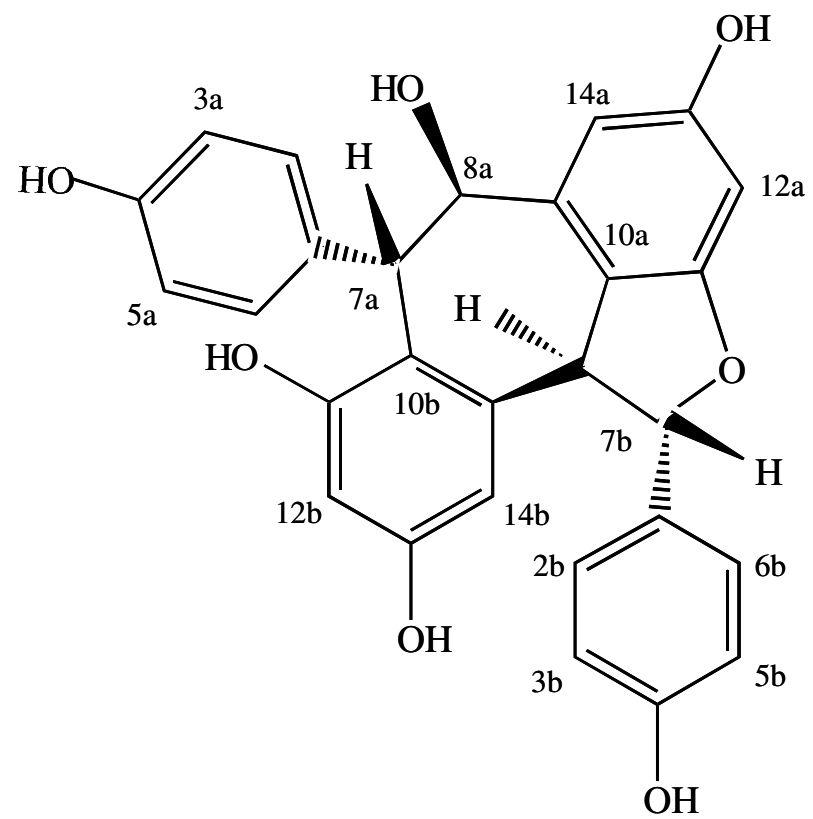


Figura 3.1.8. Formula di struttura del composto **1**: ampelopsina A.

Tabella 3.1.1. Correlazioni delle risonanze dei protoni dallo spettro COSY composto **1** (acetone).

δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)
7.12	6.78
6.90	6.64
6.44	6.23
6.61	6.15
5.76	4.16
5.45	5.41

Tabella 3.1.2. Correlazioni delle risonanze dei carboni con i protoni del composto **1** ricavate dallo spettro HSQC (acetone).

δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)
129.1	7.12
127.9	6.90
115.1	6.78
114.6	6.64
109.6	6.61
104.6	6.23
100.7	6.44
96.2	6.15
87.6	5.76
70.3	5.41
48.7	4.16
43.1	5.45

Tabella 3.1.3. Caratteristiche spettroscopiche NMR del composto **1** (acetone).

C	δC (ppm)	m	δH (ppm)	m	J (Hz)
1a	130.1	s			
2,6 a	127.9	d	6.90	d	8.5
3,5 a	114.6	d	6.64	d	8.5
4 a	158.0	s			
7 a	43.1	d	5.45	d	4.7
8 a	70.3	d	5.41	d	4.7
9 a	139.6	s			
10 a	117.5	s			
11 a	159.3	s			
12 a	96.2	d	6.15	d	2.1
13 a	158.0	s			
14 a	109.6	d	6.61	d	2.1
1 b	131.8	s			
2,6 b	129.1	d	7.12	d	8.5
3,5 b	115.1	d	6.78	d	8.5
4 b	157.6	s			
7 b	87.6	d	5.76	d	11.4
8 b	48.7	d	4.16	d	11.4
9 b	142.3	s			
10 b	118.1	s			
11 b	156.4	s			
12 b	100.7	d	6.44	d	2.1
13 b	155.2	s			
14 b	104.6	d	6.23	brs	

Identificazione del composto 2

Il composto 2 sempre isolato dall'estratto metanolico del legno sintomatico di *Vitis vinifera* cv. Sangiovese, purificato cromatograficamente si è presentato come solido amorfo di colore giallastro.

Lo spettro ES-MS del composto 2 in modalità ioni positivi (Figura 3.1.9) indica un picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ a $m/z = 455.0$ e quello dell'addotto con sodio $[M+Na]^+$ a $m/z = 477.0$. Lo spettro ES-MS dello stesso composto ma in modalità ioni negativi (Figura 3.1.10) ha mostrato un picco pseudomolecolare $[M-H]^-$ a $m/z = 453.0$; perciò tali spettri suggeriscono un peso molecolare del composto 2 pari a 454 uma. Assumendo che tale composto sia un dimero derivante da polimerizzazione ossidativa del resveratrolo, la sua formula molecolare sarebbe $C_{28}H_{22}O_6$.

In Figura 3.1.11 è riportato lo spettro 1H NMR del composto 2 che presenta risonanze tipiche dei protoni di carboni aromatici fra circa 6 e 7 ppm; nello specifico, sono evidenti due segnali doppietto di area 2 a 6.94 e 6.68 ppm che presentano la stessa costante di accoppiamento, $J = 8.5$ Hz, tali segnali sono attribuibili a protoni *orto* accoppiati in anelli aromatici *para* sostituiti presenti nelle unità monomeriche del resveratrolo.

I segnali doppietto, di area 1 a 6.55 e 6.13 ppm con costante di accoppiamento $J = 1.9$ Hz. sono da attribuire a protoni *meta* accoppiati in anelli aromatici 1,2,3,5 tetrasostituiti riscontrabili in dimeri del resveratrolo in cui una posizione *orto* a uno solo dei carboni ossigenati dell'anello trisostituito del monomero del resveratrolo viene impegnata a formare il legame nel dimero. I due segnali di area 1 che appaiono come singoletti slargati a 4.48 e 3.74 ppm sono invece da ritenere attribuibili a protoni isolati legati a carboni con ibridazione sp^3 che potrebbero derivare dalla saturazione del legame olefinico del resveratrolo nella formazione del dimero.

In Figura 3.1.12 è presentato lo spettro COSY del composto 2, il suo esame ha consentito di definire univocamente gli accoppiamenti dei protoni già suggeriti nello spettro protonico. Infine risulta evidente anche l'accoppiamento dei due segnali a 4.48 e 3.74 ppm; in Tabella 3.1.4 sono riassunti tali accoppiamenti.

In Figura 3.1.13 è riportato lo spettro ^{13}C NMR del composto 2; sono evidenti segnali di carboni aromatici ossigenati a 157.9, 154.9 e 154.1 ppm, sono presenti anche altri segnali singoletto evidenziati dalla loro scomparsa nello spettro HSQC (Fig. 3.1.14), nello specifico questi segnali risuonano a 149.4, 137.1 e 122.5 ppm. I carboni residuati nello spettro HSQC a 127.8 e 114.6 ppm, di intensità elevata, risultano essere doppietti in quanto correlano ciascuno

con un solo protone; sono carboni in *orto* degli anelli *para* sostituiti essendo legati ai protoni già precedentemente attribuiti a queste strutture. Analogamente i segnali che residuano nello spettro HSQC a 102.0 e 101.2 ppm per le correlazioni con i protoni osservate sono segnali doppietto attribuibili a strutture 1,2,3,5 sostituite e quelli a 59.5 e 53.3 ppm i due carboni vicinali singoletto sp^3 ; tutte le correlazioni osservate sono elencate nella Tabella 3.1.5.

Tenuto conto che il numero di segnali nello spettro ^{13}C NMR è di dodici fra singoletti e doppietti e che due segnali dei carboni doppietto in *orto* valgono il doppio in quanto legati agli unici protoni che hanno segnale di area doppia nello spettro 1H NMR, si ha un totale di quattordici carboni che corrispondono alla metà di quelli dello spettro di massa, pertanto la struttura dimerica sarebbe simmetrica.

I dati spettroscopici e di massa acquisiti per il composto **2**, sono concordi con quelli già presenti in letteratura per il pallidolo (Khan *et al.*, 1986; Delaunay *et al.*, 2002), di cui non è nota la configurazione assoluta ma solo quella relativa benchè non è chiara la misura di α_D in letteratura. Tuttavia la misura di α_D effettuata sul composto **2** suggerisce che tale struttura possa essere il (+)-pallidolo essendo il segno opposto a quello di α_D di letteratura per il (-)-pallidolo. Pertanto in riferimento ai dati riportati in letteratura, le caratteristiche NMR del composto **2**, il pallidolo (Fig. 3.1.15), possono essere definitivamente assegnate come riportato in Tabella 3.1.6.

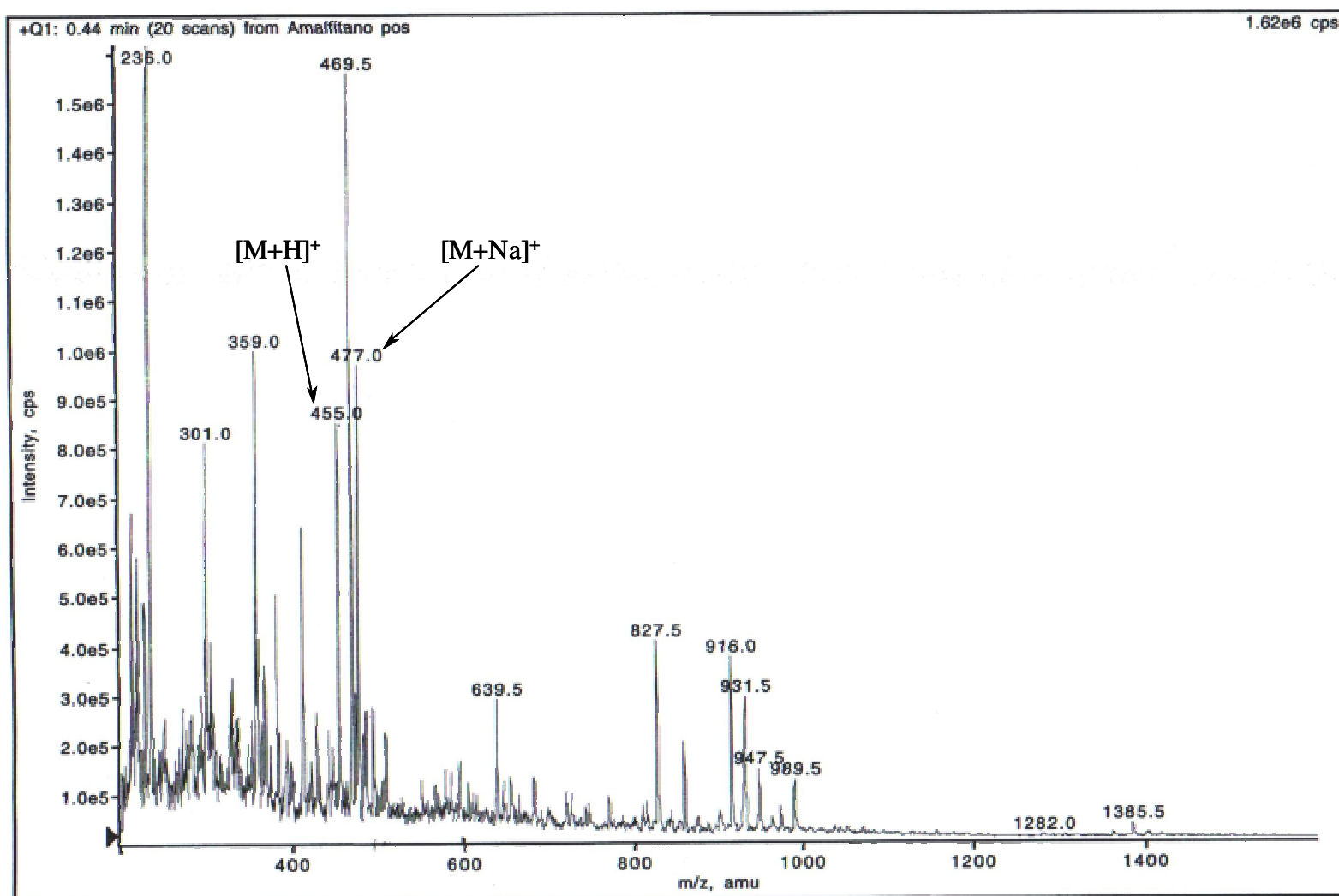


Figura 3.1.9. Spettro ES-MS in modalità ioni positivi del composto 2.

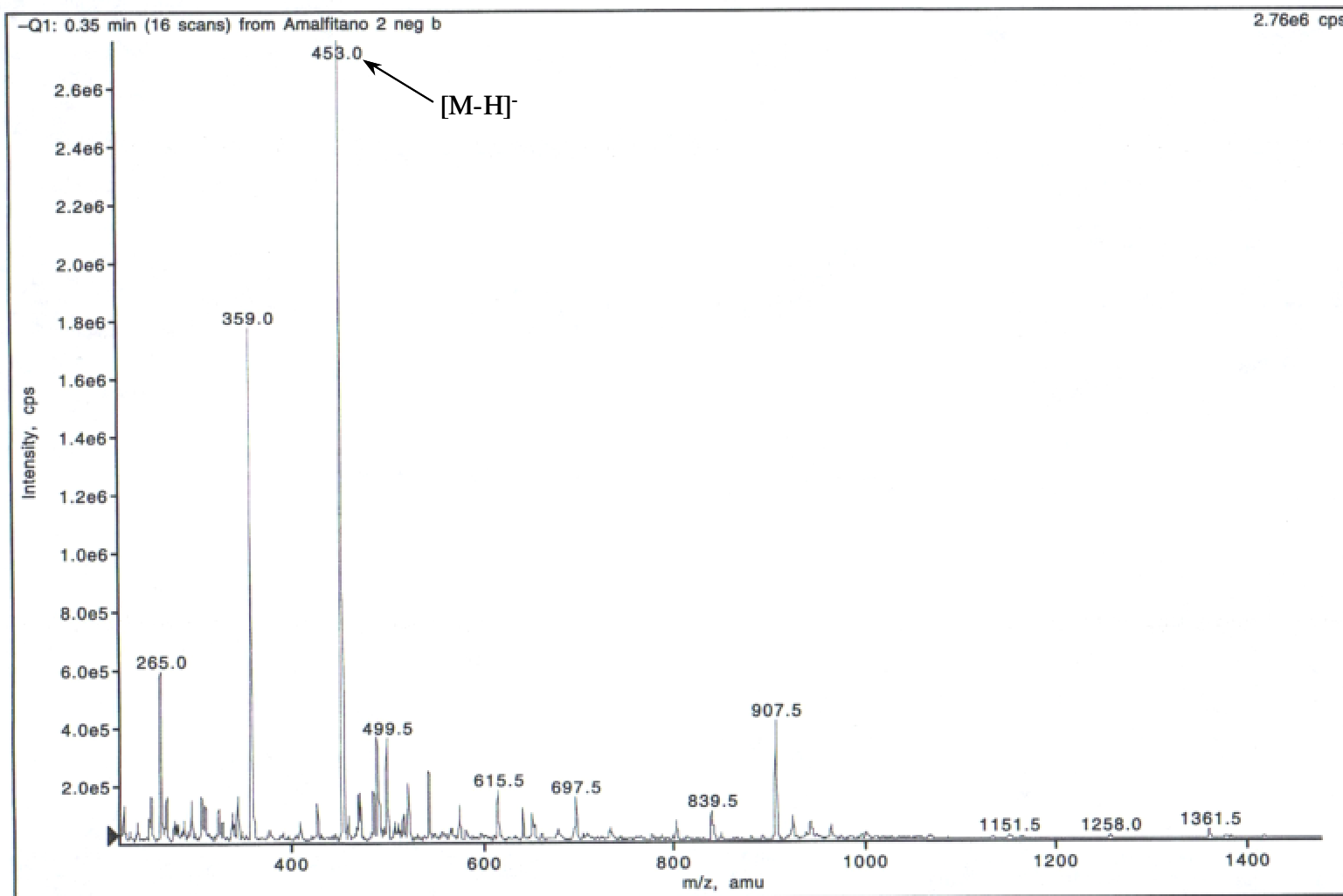


Figura 3.1.10. Spettro ES-MS in modalità ioni negativi del composto **2**.

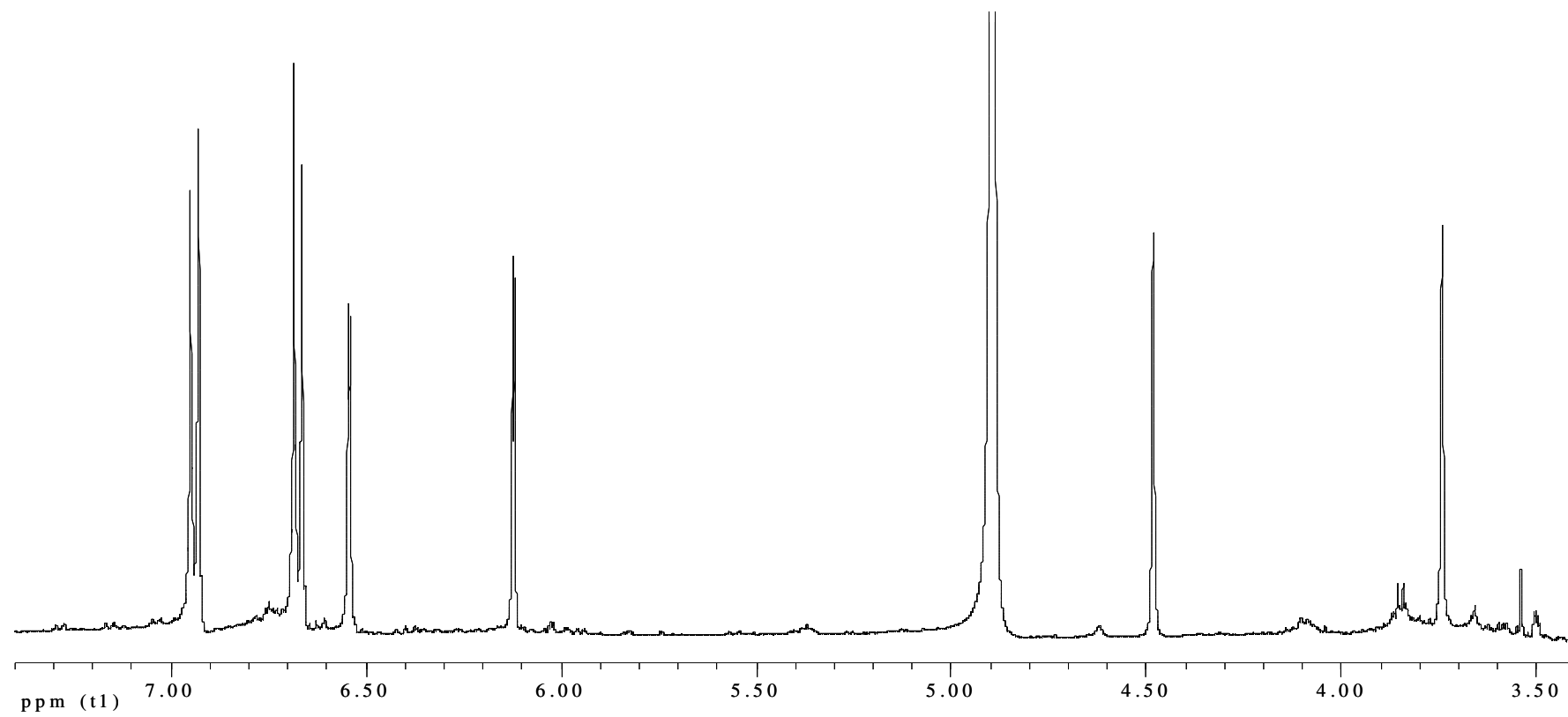


Figura 3.1.11. Spettro ^1H NMR del composto **2** in CD_3OD .

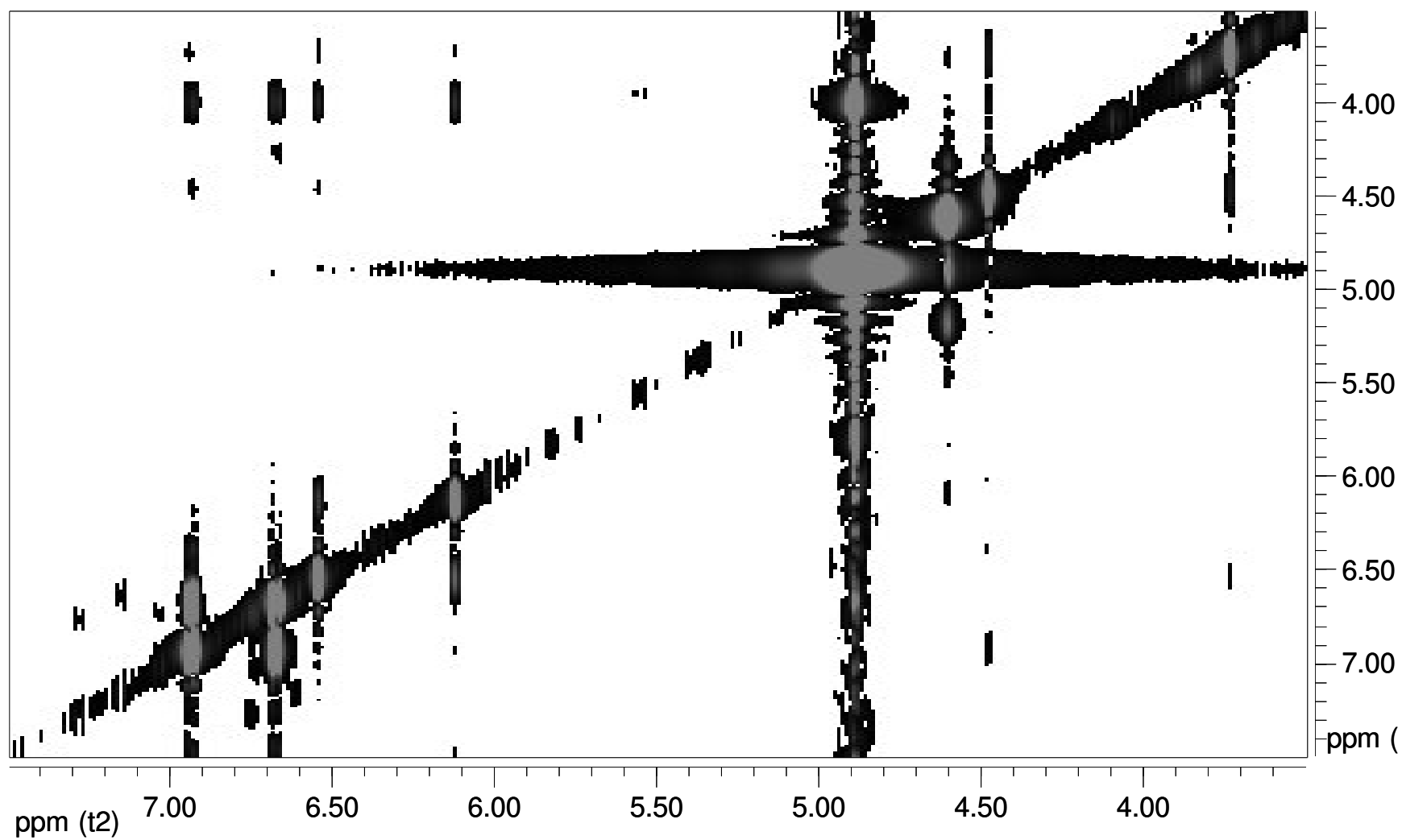


Figura 3.1.12. Spettro COSY del composto **2** in CD₃OD.

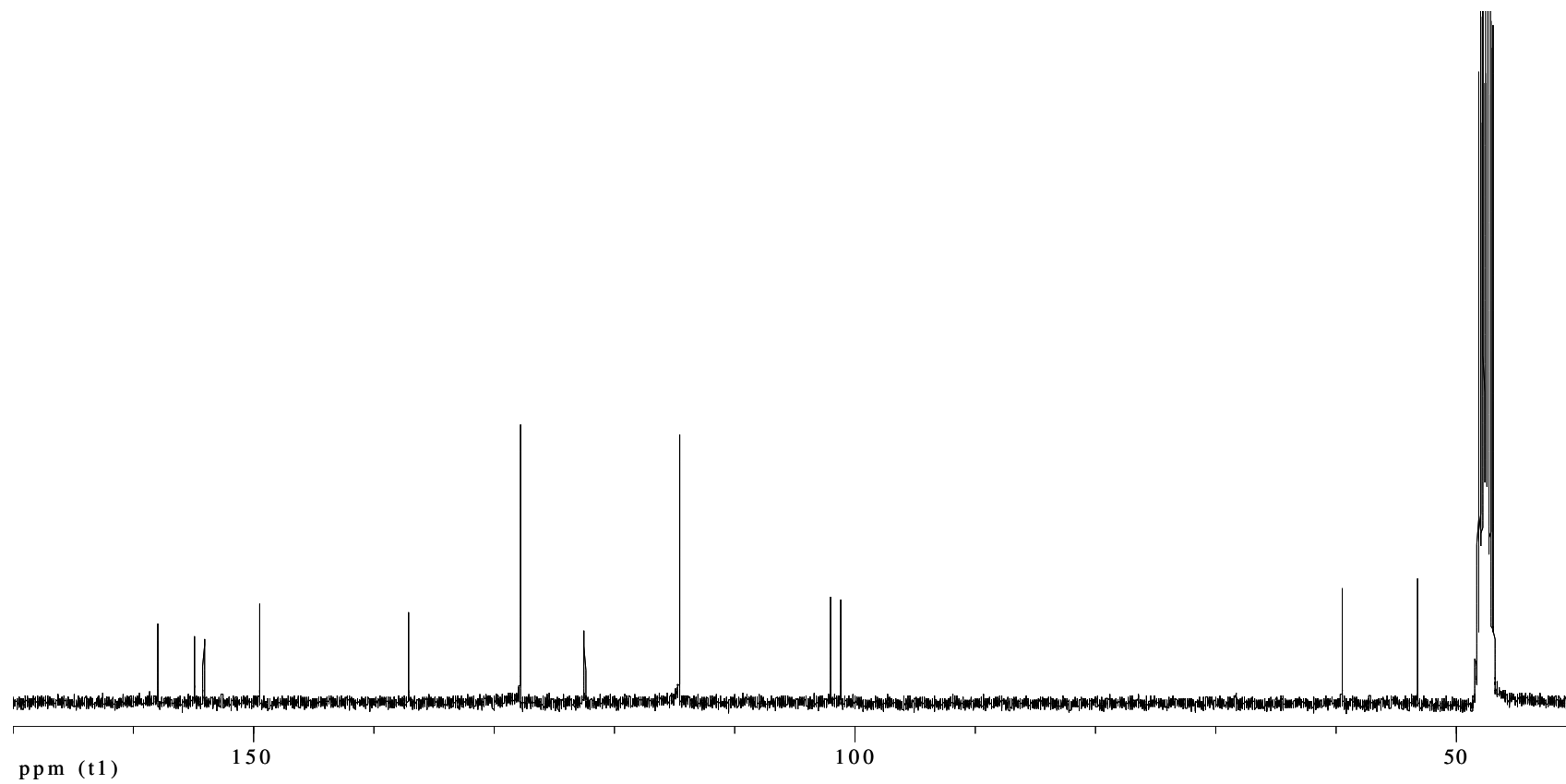


Figura 3.1.13. Spettro ^{13}C NMR del composto **2** in CD_3OD .

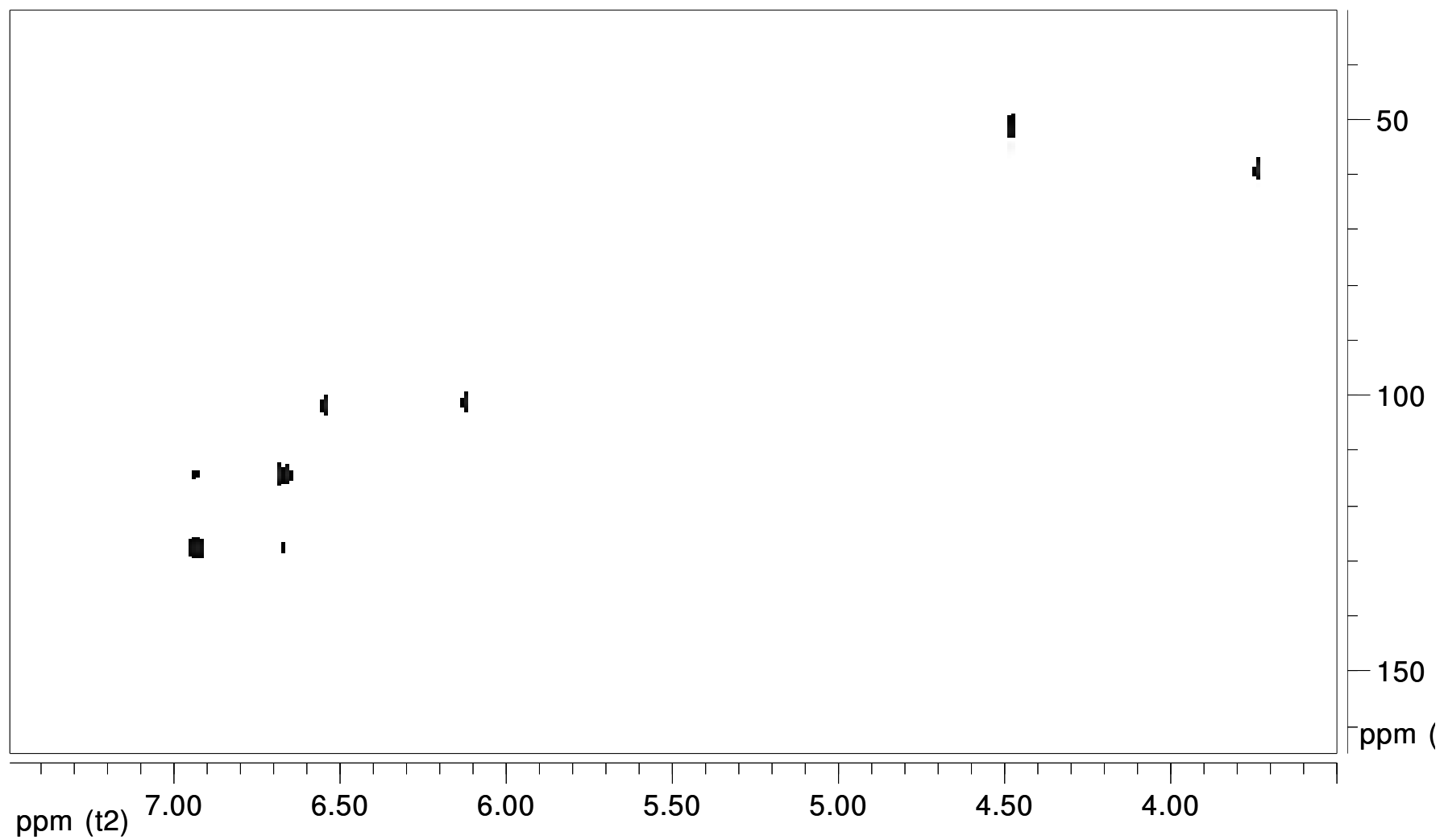


Figura 3.1.14. Spettro HSQC del composto **2** in CD₃OD.

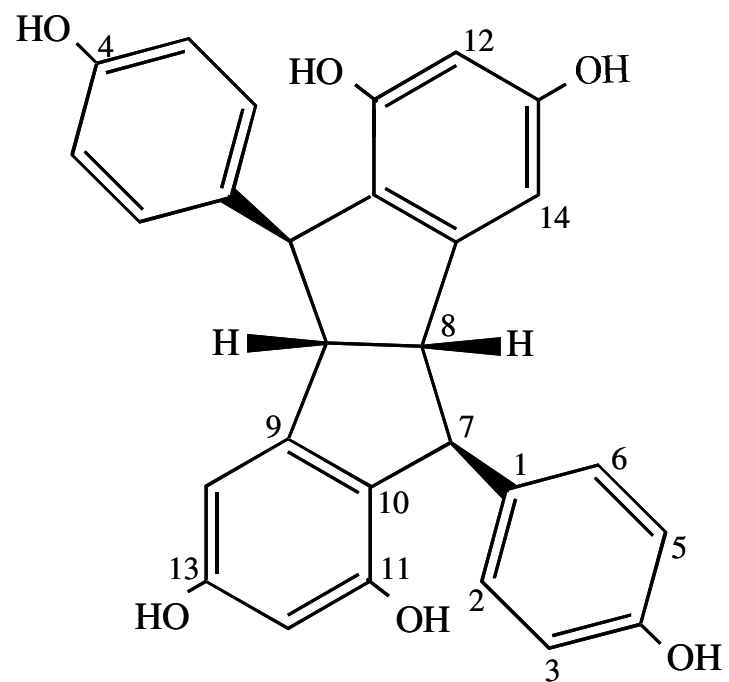


Figura 3.1.15. Formula di struttura del composto **2**: pallidolo.

Tabella 3.1.4. Correlazioni delle risonanze dei protoni dallo spettro COSY del composto **2** (metanolo).

δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)
6.94	6.68
6.55	6.13
4.48	3.74

Tabella 3.1.5. Correlazioni delle risonanze dei carboni con i protoni del composto **2** ricavate dallo spettro HSQC (metanolo).

δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)
127.8	6.94
114.6	6.68
102.0	6.13
101.2	6.55
59.5	3.74
53.3	4.48

Tabella 3.1.6. Caratteristiche spettroscopiche NMR del composto **2** (metanolo).

C	δC (ppm)	m	δH (ppm)	m	J (Hz)
1a,b	137.1	s			
2,6 a,b	127.8	d	6.94	d	8.51
3,5 a,b	114.6	d	6.68	d	8.51
4 a,b	154.9	s			
7 a,b	53.3	d	4.48	brs	
8 a,b	59.5	d	3.74	brs	
9 a,b	149.4	s			
10 a,b	122.5	s			
11 a,b	154.1	s			
12 a,b	101.2	d	6.55	d	1.88
13 a,b	157.9	s			
14 a,b	102.0	d	6.13	d	1.96

Identificazione del composto 3

Il composto **3** isolato dall'estratto metanolico del legno bruno-rosso della *Vitis vinifera* cv. Sangiovese e purificato cromatograficamente, si è presentato come solido amorfo di colore giallastro.

Lo spettro ES-MS di tale composto, in modalità ioni positivi mostra un picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ a $m/z = 679.2$ e un picco dell'addotto con sodio $[M+Na]^+$ a $m/z = 701.2$ (Fig. 3.1.16). Lo spettro ES-MS dello stesso composto ma in modalità ioni negativi ha mostrato un picco pseudomolecolare $[M-H]^-$ a $m/z = 677.2$ (Fig. 3.1.17). Tali spettri suggeriscono un peso molecolare del composto **3** di 678 uma, assumendo che anche questo sia un oligomero derivante da polimerizzazione ossidativa del resveratrolo, esso corrisponderebbe ad un trimero la cui formula molecolare sarebbe $C_{42}H_{30}O_9$.

In Figura 3.1.18 è riportato lo spettro 1H NMR del composto in esame. La struttura trimera potrebbe avere tre coppie diverse di segnali doppietto di protoni *orto* accoppiati in anelli *para* sostituiti, queste coppie sono individuabili in maniera abbastanza certa, tenendo anche conto delle costanti di accoppiamento pari a $J = 8.4$ Hz come tipicamente si osserva in protoni *orto* accoppiati, in tutta una serie di doppietti presenti nello spettro. Una di queste coppie è quella a 7.13 ppm con 6.72 ppm come confermato dalla correlazione COSY (Fig. 3.1.19), in cui si evidenzia inoltre che il segnale a 6.72 ppm correla anche con quello a 6.94 ppm, quest'ultimo sovrapposto al segnale a 6.97 ppm nello spettro 1H NMR tanto da sembrare nell'insieme un tripletto, essi costituiscono una seconda coppia di protoni *orto*. Infatti il segnale a 6.72 ppm ha un'area, pari a 4, doppia rispetto a quella dei due protoni correlati e quindi corrisponderebbe a due distinti tipi di protoni con risonanze coincidenti. La terza coppia nello spettro 1H NMR che viene confermata nel COSY risulterebbe quella del segnale a 6.97 ppm di area 2 con quello a 6.68 ppm, tuttavia quest'ultimo ha un'area 1.5 volte quella del segnale del protone in correlazione a 6.97 ppm poichè è evidente che vi si sovrappone un ulteriore segnale doppietto a 6.67 ppm di piccola costante di accoppiamento che correla al COSY con il doppietto a 6.22 ppm di area 1, questa ultima coppia di protoni rappresenterebbe un accoppiamento *meta* anche in ragione del fatto che la costante è $J = 2.0$ Hz. Nello spettro 1H NMR sono presenti altre due coppie di segnali doppietto di area 1 con costante di accoppiamento $J = 2.0$ Hz ascrivibili a protoni *meta* accoppiati in correlazione COSY come segue: 6.48 ppm con 6.18 ppm e 6.23 ppm con 5.85 ppm, questo indica la presenza di tre anelli aromatici 1,2,3,5 tetrasostituiti derivanti dalla condensazione ossidativa che coinvolge le unità 1,3,5 trisostituite delle tre molecole di resveratrolo.

Nello spettro ^1H NMR sono presenti altre due coppie di segnali doppietto di area 1, anche in correlazione COSY fra loro, a 5.89 ppm con 4.62 ppm con costante di accoppiamento $J = 9.2$ Hz, e a 4.69 ppm con 4.48 ppm con $J = 7.0$ Hz. Rimangono altri due segnali slargati di area 1 nello spettro ^1H NMR, correlati nello spettro COSY, che risuonano a 6.09 e 3.93 ppm. Tutti questi segnali sono riconducibili a protoni su carboni sp^3 tipici degli anelli diidrobenzofuranici, uno dei raggruppamenti caratteristici derivanti dalla condensazione fra molecole di resveratrolo. Tutte le correlazioni COSY illustrate tra i vari segnali protonici sono riportate nella Tabella 3.1.7.

In Figura 3.1.20 è riportato lo spettro ^{13}C NMR del composto **3**, sono evidenti nove segnali relativi ai carboni aromatici ossigenati, ovviamente assenti nello spettro HSQC (Fig. 3.1.21), a 162.2, 161.9, 161.2, 161.1, 159.6, 159.5, 158.8, 158.5, 158.0 ppm, in accordo con la struttura di un trimero del resveratrolo. Altri nove segnali, presenti nello spettro ^{13}C NMR, ma assenti nello spettro HSQC, sono quelli relativi ai carboni quaternari aromatici, a 141.3, 140.0, 139.4, 133.1, 132.9, 132.8, 124.9, 121.5 e 120.2 ppm.

Il resto dei segnali nello spettro ^{13}C NMR del composto **3**, residuano anche nello spettro HSQC, risultano essere solo segnali doppietto poiché correlano con un solo protone, in Tabella 3.1.8 sono riportate tali correlazioni. Il numero di segnali tra doppietti e singoletti è trentasei cui tuttavia corrispondono quarantadue carboni poiché sei segnali più intensi sono attribuibili ciascuno a due carboni, come si evince dalle correlazioni HSQC con i protoni e le rispettive aree dei loro segnali nello spettro ^1H NMR, pertanto la struttura è un trimero i cui dati NMR corrispondono in gran parte a quelli di letteratura dell' α -viniferina in acetone deuterato (Fig. 3.1.22), di cui non è nota la configurazione assoluta, (Pryce e Langcake, 1977; Kitakana *et al.*, 1990). La coincidenza della struttura della molecola **3** isolata con quella di letteratura è stata confermata ulteriormente eseguendo anche uno spettro protonico in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (Fig. 3.1.23) le cui risonanze sono coincidenti con quelle di letteratura. Inoltre la misura di α_D del composto **3** concorda con la quella di letteratura della (-)- α -viniferina. Pertanto, coerentemente con i dati riportati in letteratura, tutte le attribuzioni dei segnali NMR relativi ai nuclei del composto **3**, la (-)- α -viniferina, sono riportate in Tabella 3.1.9.

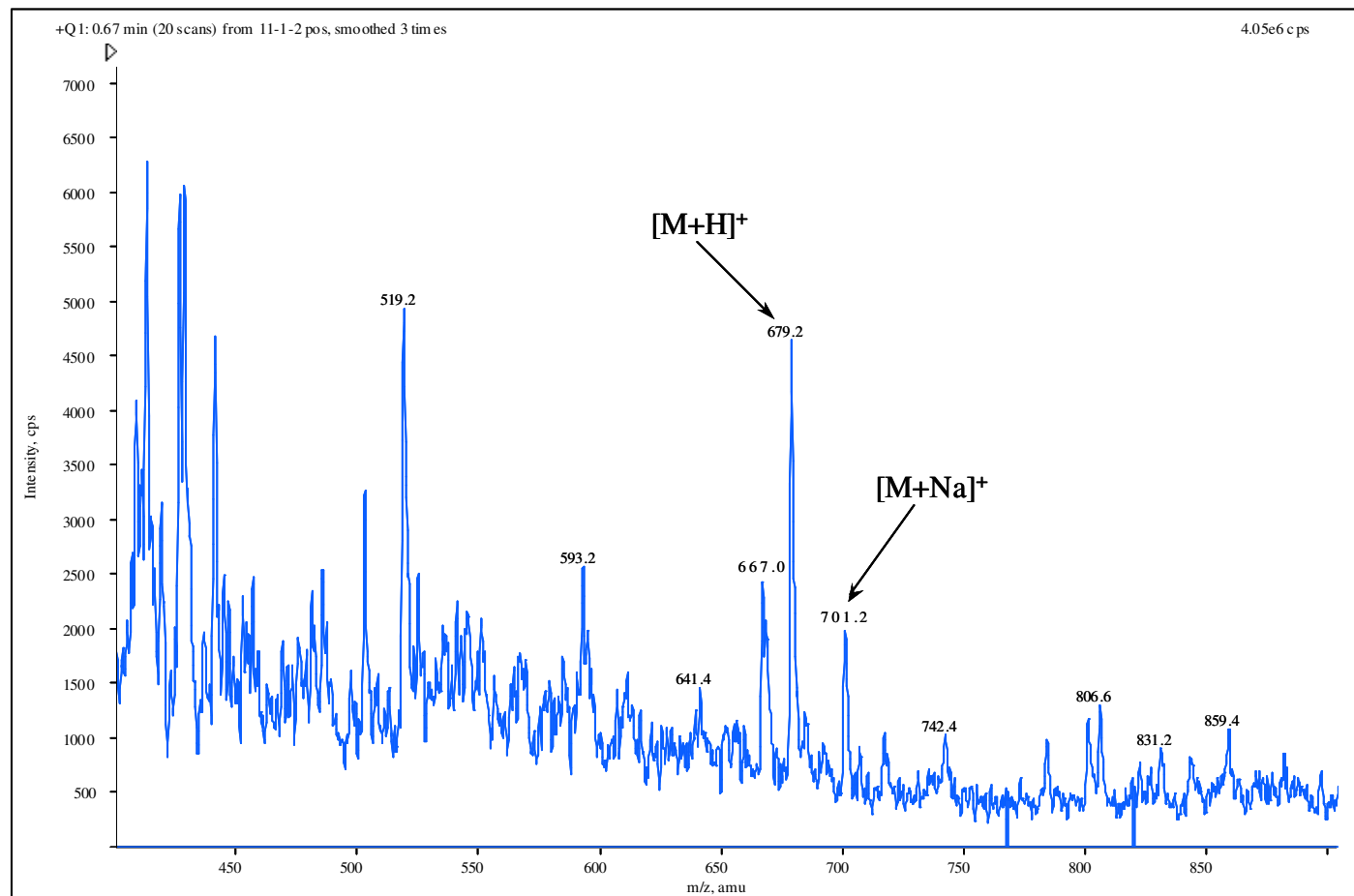


Figura 3.1.16. Spettro ES-MS in modalità ioni positivi del composto **3**.

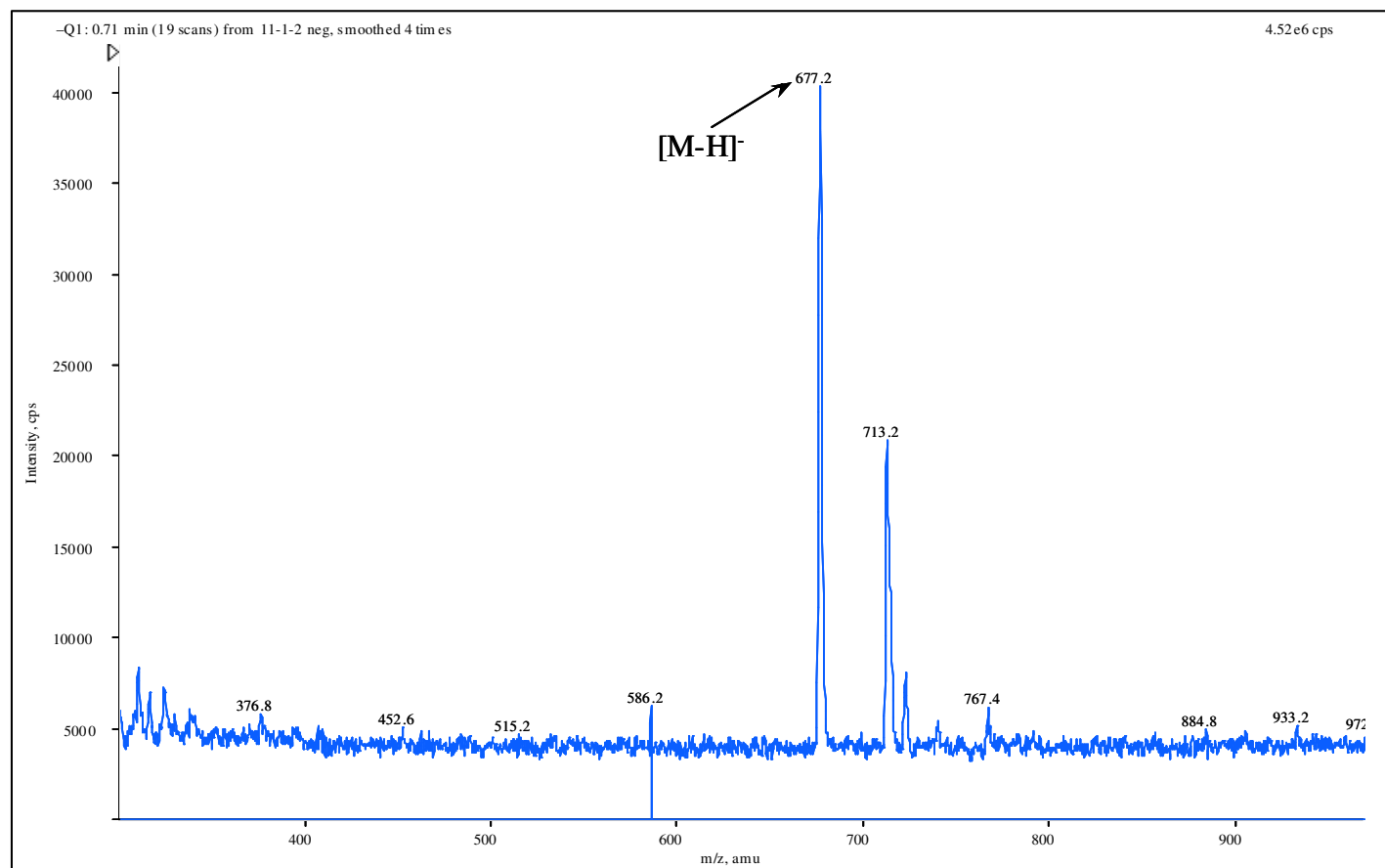


Figura 3.1.17. Spettro ES-MS in modalità ioni negativi del composto **3**.

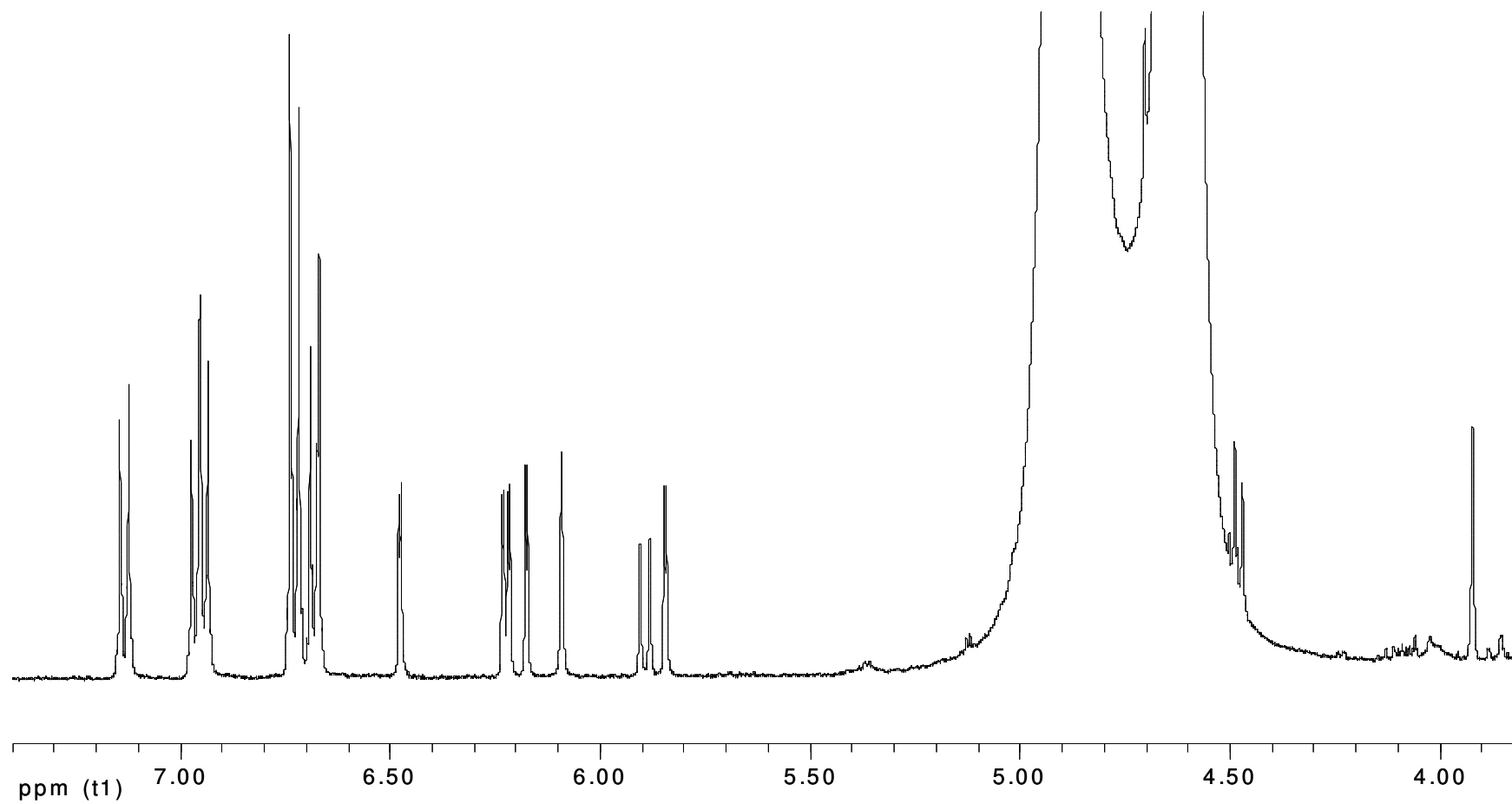


Figura 3.1.18. Spettro ^1H NMR del composto **3** in CD_3OD .

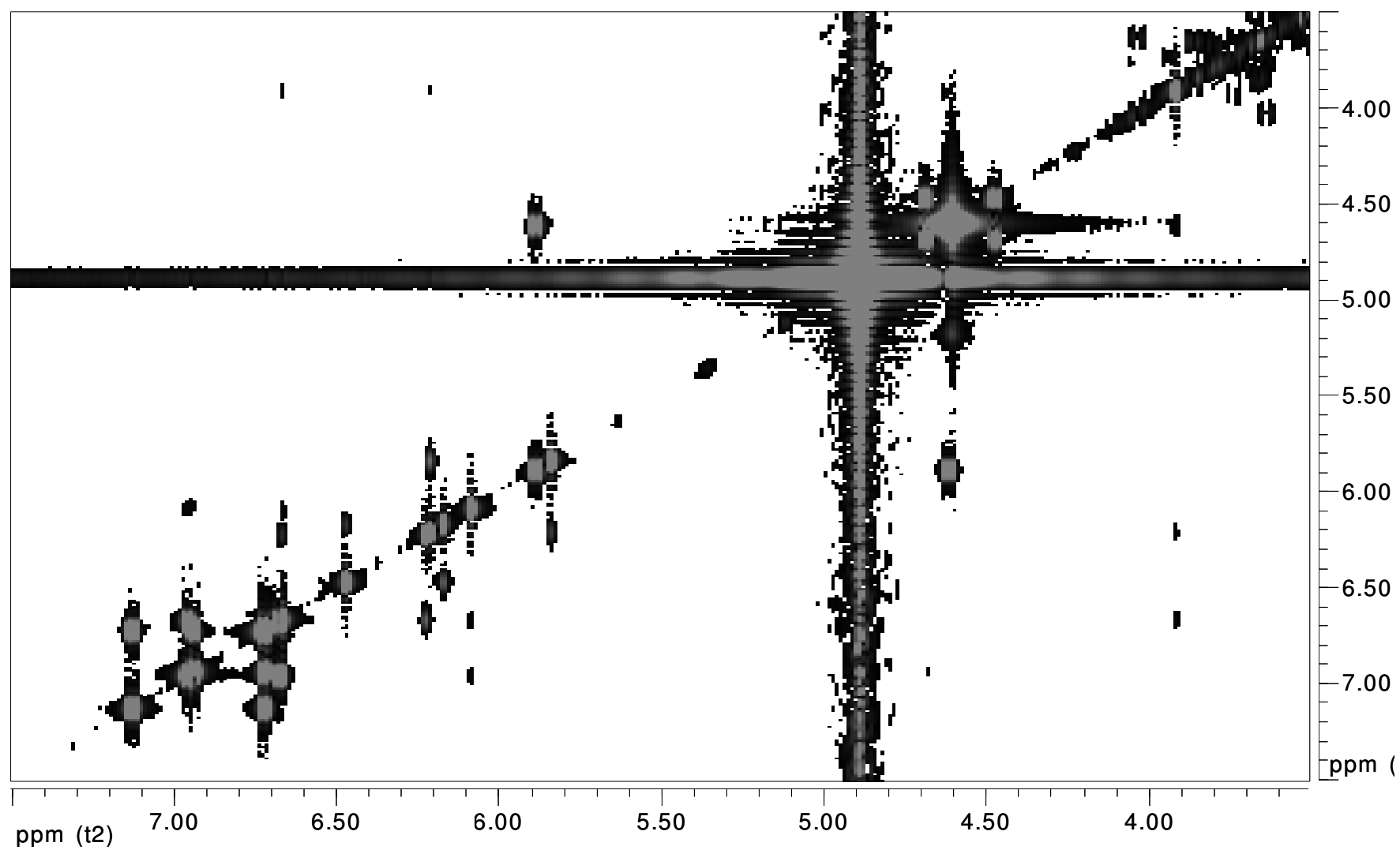


Figura 3.1.19. Spettro COSY NMR del composto **3**.

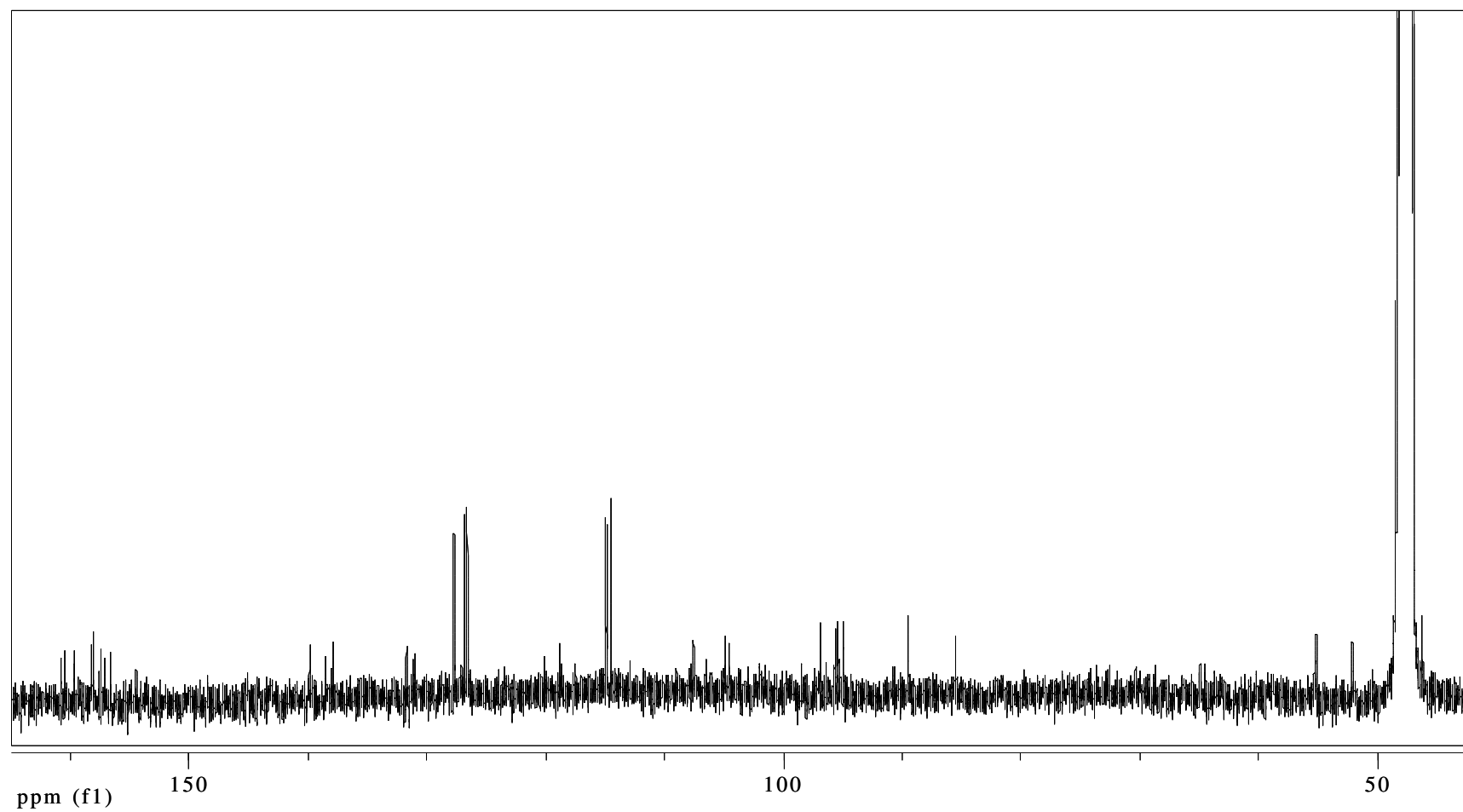


Figura 3.1.20. Spettro ^{13}C NMR del composto **3** in CD_3OD .

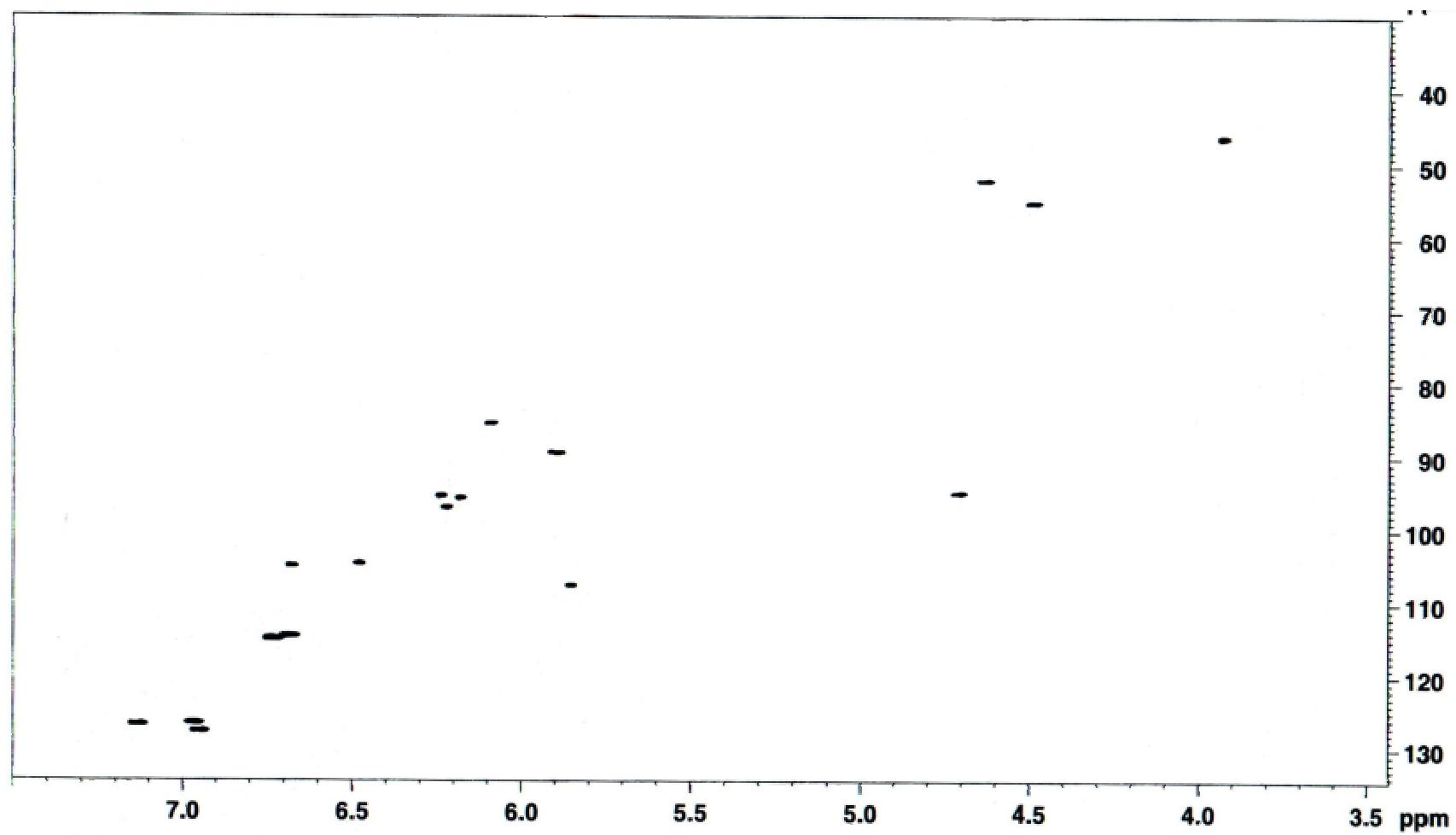


Figura 3.1.21. Spettro HSQC del composto **3** in CD₃OD.

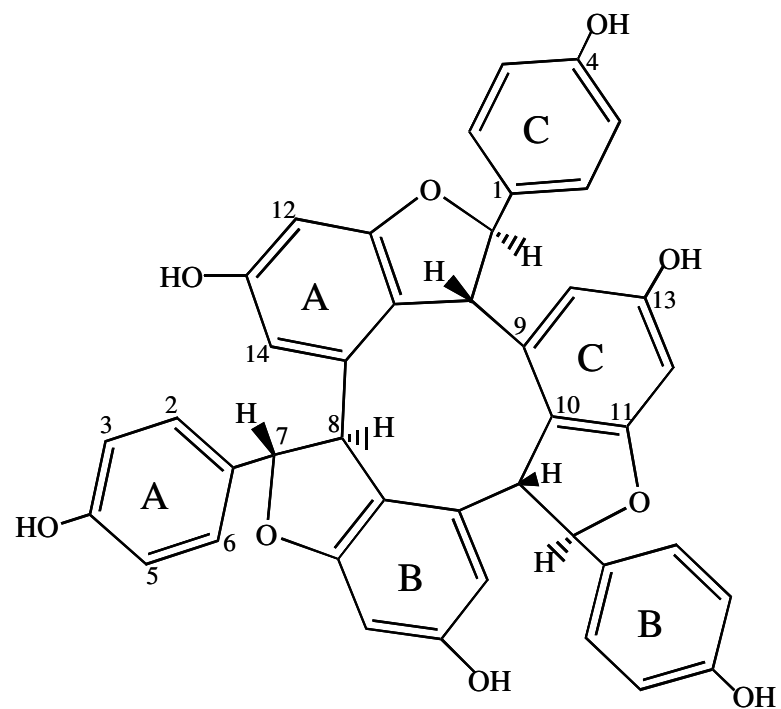


Figura 3.1.22. Formula di struttura del composto **3**: α -viniferina.

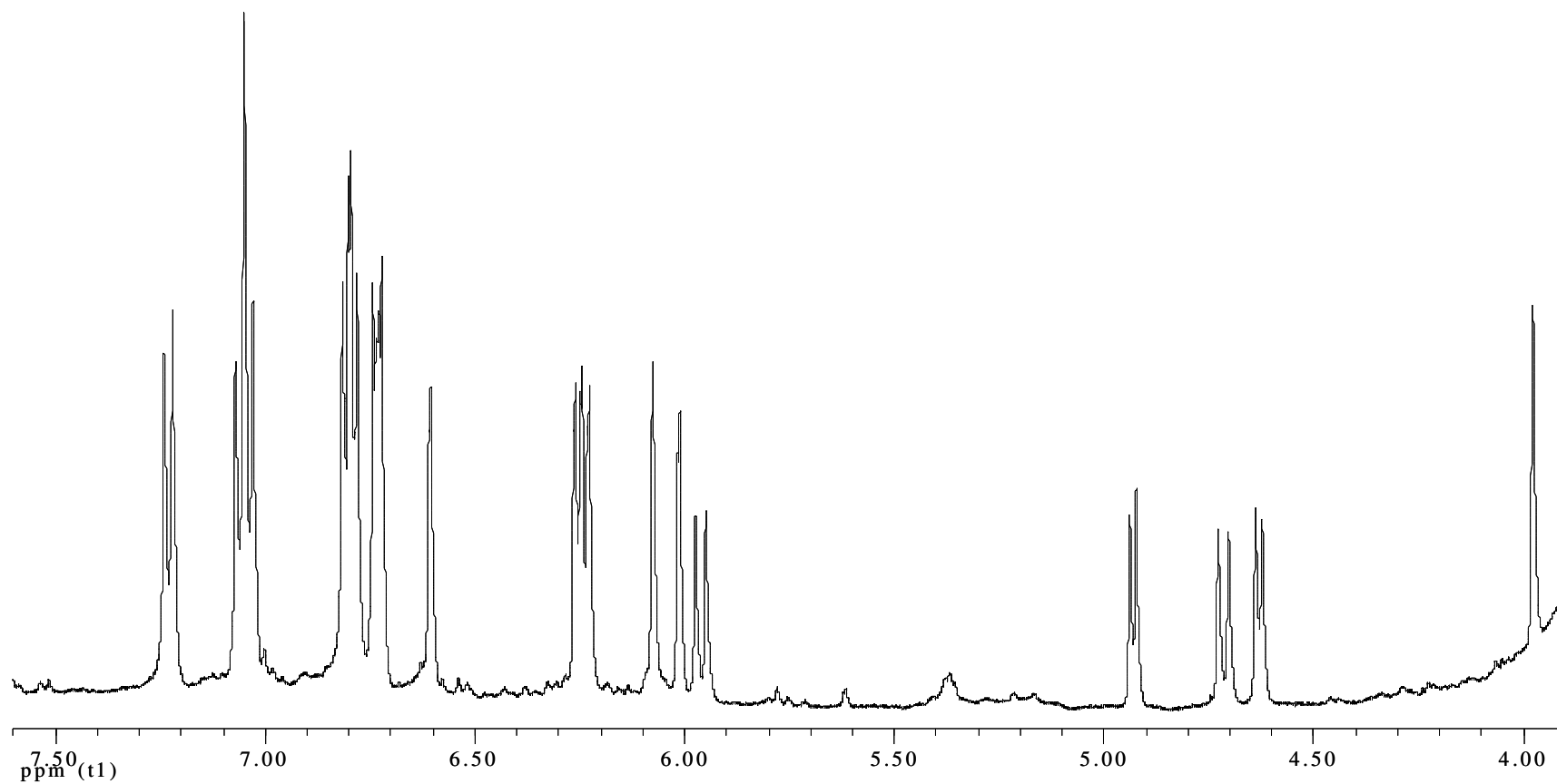


Figura 3.1.23. Spettro ^1H NMR del composto **3** in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Tabella 3.1.7. Correlazioni delle risonanze dei protoni dallo spettro COSY del composto **3** (metanolo).

δH (ppm)	δH (ppm)
7.13	6.72
6.97	6.68
6.94	6.72
6.48	6.18
6.23	5.85
6.22	6.67
5.89	4.62
6.09	3.93
4.69	4.48

Tabella 3.1.8. Correlazioni delle risonanze dei protoni dallo spettro HSQC del composto **3** (metanolo).

δC (ppm)	δH (ppm)
129.1	6.94
128.3	7.13
128.0	6.97
116.3	6.72
116.2	6.68
115.9	6.72
108.9	5.85
106.3	6.67
106.0	6.48
98.4	6.22
97.1	6.18
96.8	6.23
96.4	4.69
90.9	5.89
86.9	6.09
56.6	4.48
53.5	4.62
47.7	3.93

Tabella 3.1.9. Caratteristiche spettroscopiche NMR del composto **3** (metanolo).

C	δC (ppm)	m	δH (ppm)	m	J (Hz)
1 a	132.8	s			
2,6 a	128.0	d	6.97	d	8.4
3,5 a	116.3	d	6.72	d	8.4
4 a	158.0	s			
7 a	86.9	d	6.09	brs	
8 a	47.7	d	3.93	brs	
9 a	140.0	s			
10 a	124.9	s			
11 a	161.1	s			
12 a	96.8	d	6.23	d	2.0
13 a	159.6	s			
14 a	108.9	d	5.85	d	2.0
1 b	133.1	s			
2,6 b	129.1	d	6.94	d	8.4
3,5 b	116.2	d	6.68	d	8.4
4 b	158.8	s			
7 b	96.4	d	4.69	d	7.0
8 b	56.6	d	4.48	d	7.0
9 b	141.3	s			
10 b	120.2	s			
11 b	161.9	s			
12 b	98.4	d	6.22	d	2.0
13 b	159.5	s			
14 b	106.0	d	6.48	d	2.0
1 c	132.9	s			
2,6 c	128.3	d	7.13	d	8.4
3,5 c	115.9	d	6.72	d	8.4
4 c	158.5	s			
7 c	90.9	d	5.89	d	9.2
8 c	53.5	d	4.62	d	9.2
9 c	139.4	s			
10 c	121.5	s			
11 c	162.2	s			
12 c	97.1	d	6.18	d	2.0
13 c	161.2	s			
14 c	106.3	d	6.67	d	2.0

Analisi HPLC degli estratti metanolici dei legni

In Figura 3.1.24 sono mostrati i cromatogrammi degli estratti metanolici del legno bruno-rosso e asintomatico con le attribuzioni dei picchi alle molecole identificate. I cromatogrammi sono molto simili qualitativamente.

La presenza dello pterostilbene è stata esclusa in entrambi i legni poiché non apparivano picchi cromatografici significativi al tempo di ritenzione dello standard, e d'altra parte non erano coincidenti con quello dello pterostilbene coiniettato.

I dati relativi alle determinazioni dei polifenoli di risposta dei legni bruno-rosso e asintomatico sono riportati in Tabella 3.1.10, dove viene anche indicata la somma dei contenuti di *trans* e *cis*- ϵ -viniferina e di *trans* e *cis*-resveratrolo che corrisponderebbero agli effettivi contenuti di *trans*- ϵ -viniferina e *trans*-resveratrolo originariamente presenti nel legno, avendo assunto che le forme *cis* di queste molecole siano un artefatto di estrazione. L'ammontare dei polifenoli identificati è più elevato nel legno bruno-rosso (3.4% del legno, pari al 49.1% dell'estratto) rispetto a quello del legno asintomatico (1.1% del legno, pari al 20.1% dell'estratto). Le determinazioni attuali per HPLC del resveratrolo e soprattutto dell' ϵ -viniferina non coincidono con quelle del precedente lavoro dove erano derivanti dalle rese ottenute dall'isolamento delle molecole (Amalfitano *et al.*, 2000). Viene generalmente confermato un maggior accumulo di questi tipici metaboliti da stress della vite nella zona infetta bruno-rossa del legno (Amalfitano *et al.*, 2000; Cichewicz e Kouzi, 2002). L'ampelopsina B appare presente solo nell'estratto del legno bruno-rosso, essa non è mai stata rilevata in tessuti aerei se non in semi di Iris (Keckeis *et al.*, 2000) e isolata in origine nelle radici di una Vitacea (Oshima e Ueno, 1993). L' α -viniferina è l'unico metabolita da stress assente nel legno bruno-rosso ma abbondante nel legno asintomatico. Langcake (1981) mostra che l' α -viniferina è più attiva del resveratrolo contro patogeni fungini come *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* e in seguito a inoculo fogliare con *Plasmopara viticola* si accumula nella zona di infezione nel giro di quattro giorni ma scompare al settimo.

Nel legno bruno-rosso si registrano accumuli più elevati di resveratrolo e soprattutto di ϵ -viniferina, come si evince chiaramente dai valori molari nell'ordine delle decine di $\mu\text{mol/g}$ contro alcune $\mu\text{mol/g}$ degli altri oligomeri. Sebbene dati quantitativi su resveratrolo ed ϵ -viniferina nei legni malati di vite non siano riportati in letteratura, quelli registrati nel legno bruno-rosso sono tra uno e tre ordini di grandezza più alti rispetto a quelli accumulati in pochi

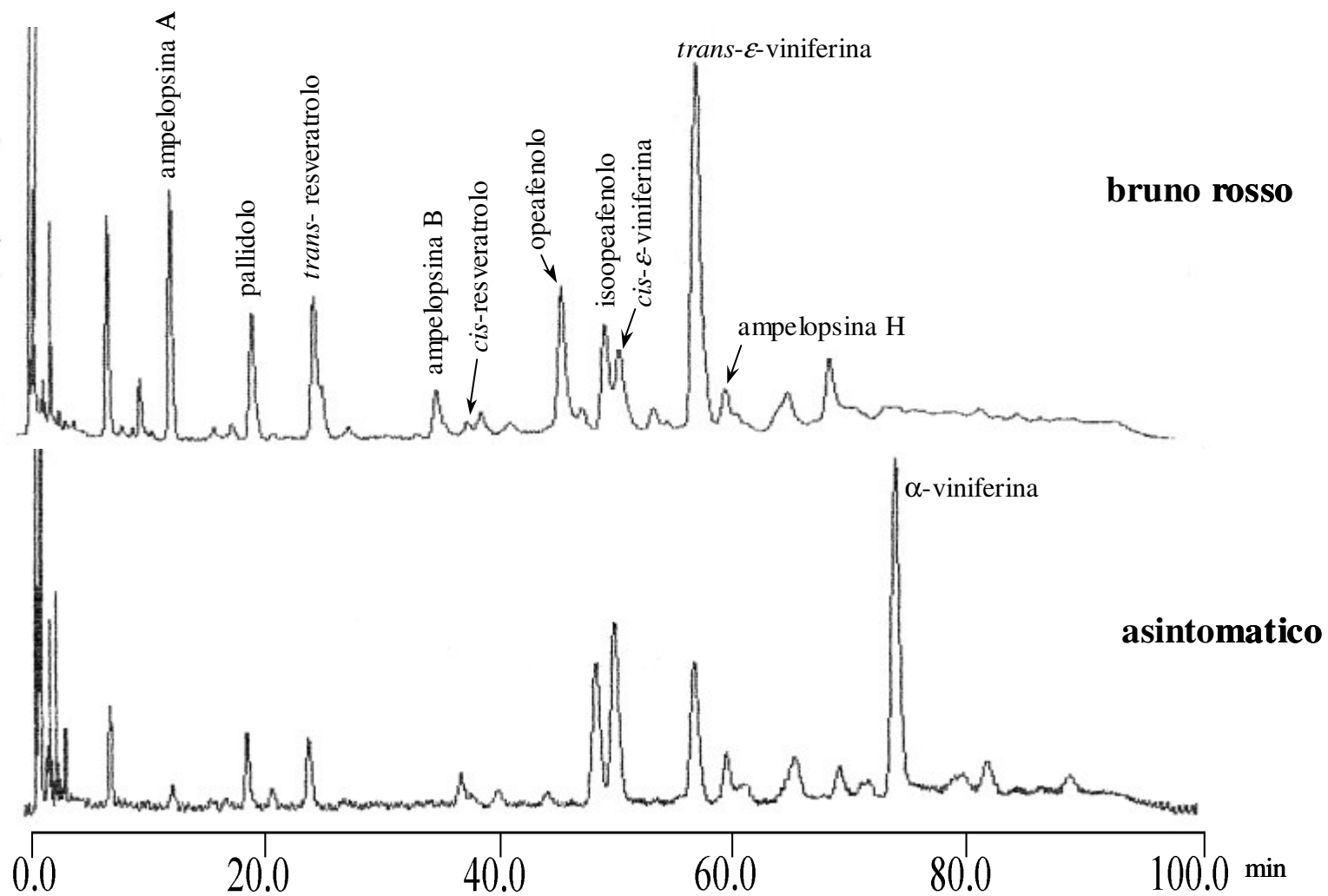


Figura 3.1.24. Cromatogrammi degli estratti metanolici dei legni brunello rosso ed asintomatico.

Tabella 3.1.10. Analisi quantitativa dei metaboliti negli estratti metanolici dei legni legni asintomatico (AS) e bruno rosso (BR).

		mg/g estratto	mg/g legno	μmoli/g legno	$*\Delta^i = (C_{BR}^i - C_{AS}^i) / C_{AS}^i$
<i>trans</i> -resveratrolo	AS	7,8	0,43	1,9	6,14
	BR	45	3,1	14	
<i>cis</i> - resveratrolo	AS	6,2	0,35	1,5	0,51
	BR	7,5	0,52	2,3	
<i>trans+cis</i> - resveratrolo	AS	14	0,8	3,4	3,64
	BR	52	3,6	16	
<i>trans</i> - ϵ -viniferina	AS	24	1,3	2,9	8,20
	BR	175	12	27	
<i>cis</i> - ϵ -viniferina	AS	22	1,2	2,6	0,51
	BR	26	1,8	4,0	
<i>trans+cis</i> - ϵ -viniferina	AS	45	2,5	5,5	4,54
	BR	201	14	31	
pallidolo	AS	7,3	0,41	0,90	5,39
	BR	38	2,6	5,7	
ampelopsina A	AS	4,1	0,23	0,48	10,46
	BR	38	2,6	5,5	
ampelopsina B	AS	nd	nd	nd	∞
	BR	7,1	0,49	1,1	
α -viniferina	AS	84	4,7	6,9	-1,00
	BR	nd	nd	nd	
opeafenolo	AS	<3,2	<0,18	<0,20	>26,75
	BR	73	5,0	5,5	
isoopeafenolo	AS	27	1,5	1,6	1,13
	BR	46	3,2	3,5	
ampelopsina H	AS	20	1,1	1,2	1,27
	BR	37	2,5	2,8	
Totale	AS	201	11	20	
	BR	491	34	71	

* C_{BR}^i e C_{AS}^i : concentrazioni molari del metabolita "i" nel legno BR e AS, rispettivamente.

giorni nelle foglie fresche e nelle bacche di *Vitis vinifera* inoculate con *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* e altri patogeni, o irradiate con raggi UV (Langcake and Pryce, 1976; Langcake and McCarthy, 1979; Langcake, 1981; Pool *et al.*, 1981; Sarig *et al.*, 1997).

Nel legno asintomatico il contenuto di resveratrolo è dello stesso ordine di grandezza di quello riportato in letteratura nel legno di *Vitis vinifera* sane (Langcake and Pryce, 1976), mentre per l' ϵ -viniferina non sono stati trovati in letteratura dati di confronto. A causa della carenza di dati sui contenuti di tali metaboliti da stress in legni di vite e poiché non sono stati effettuati confronti congrui con i contenuti di piante sane, i loro livelli rilevati nel legno asintomatico non danno suggerimenti sull'eventuale loro accumulo sistemico dovuto alla malattia.

Gli incrementi dei metaboliti nel legno bruno-rosso rispetto al legno asintomatico, riferiti al loro contenuto nell'asintomatico, $\Delta^i = (C_{BR}^i - C_{AS}^i) / C_{AS}^i$, non sono omogenei (Tabella 3.1.10), in particolare, rispetto al resveratrolo, quelli registrati per ampelopsina H e isoopeafenolo sono più bassi, mentre quelli di ampelopsina B, opeafenolo, ampelopsina A, pallidolo e ϵ -viniferina, in ordine decrescente di Δ , sono più alti, suggerendo che questi ultimi polifenoli siano preferenzialmente prodotti dal resveratrolo per polimerizzazione ossidativa nella zona del legno soggetta a imbrunimento. Tuttavia gli incrementi relativi dei vari metaboliti possono essere stati influenzati da una loro diversa capacità di diffondere nei tessuti legnosi, da specifiche attività degradative per ciascuna viniferina da parte dei patogeni, o da processi di condensazione, attraverso reazioni radicaliche nell'ambito della risposta ossidativa della pianta, in cui i polifenoli potrebbero essere diversamente immobilizzati e resi inestraibili. Il $\Delta = -1$ dell' α -viniferina, dovuto alla sua totale assenza nel legno bruno-rosso, induce a supporre che ne sia stata inibita la sintesi o che sia stata velocemente degradata.

Reazione di Fenton sugli estratti metanolici dei legni

Nella miscela di polifenoli estratta dal legno sintomatico, non frazionato in zone di diversa espressione dei sintomi, erano chiaramente visibili all'analisi HPLC essenzialmente tutti i picchi dei polifenoli identificati tranne quelli dell'ampelopsina B e del *cis*-resveratrolo e della *cis*- ϵ -viniferina (Fig. 3.1.25 t_0); d'altra parte il primo è un componente scarsamente presente solo nel legno bruno-rosso, mentre gli altri due potrebbero non essersi formati per isomerizzazione dalle forme *trans* nelle fasi di estrazione. La soluzione acquosa dell'estratto metanolico sottoposta a reazione di Fenton dopo pochi secondi dall'aggiunta dei reagenti si

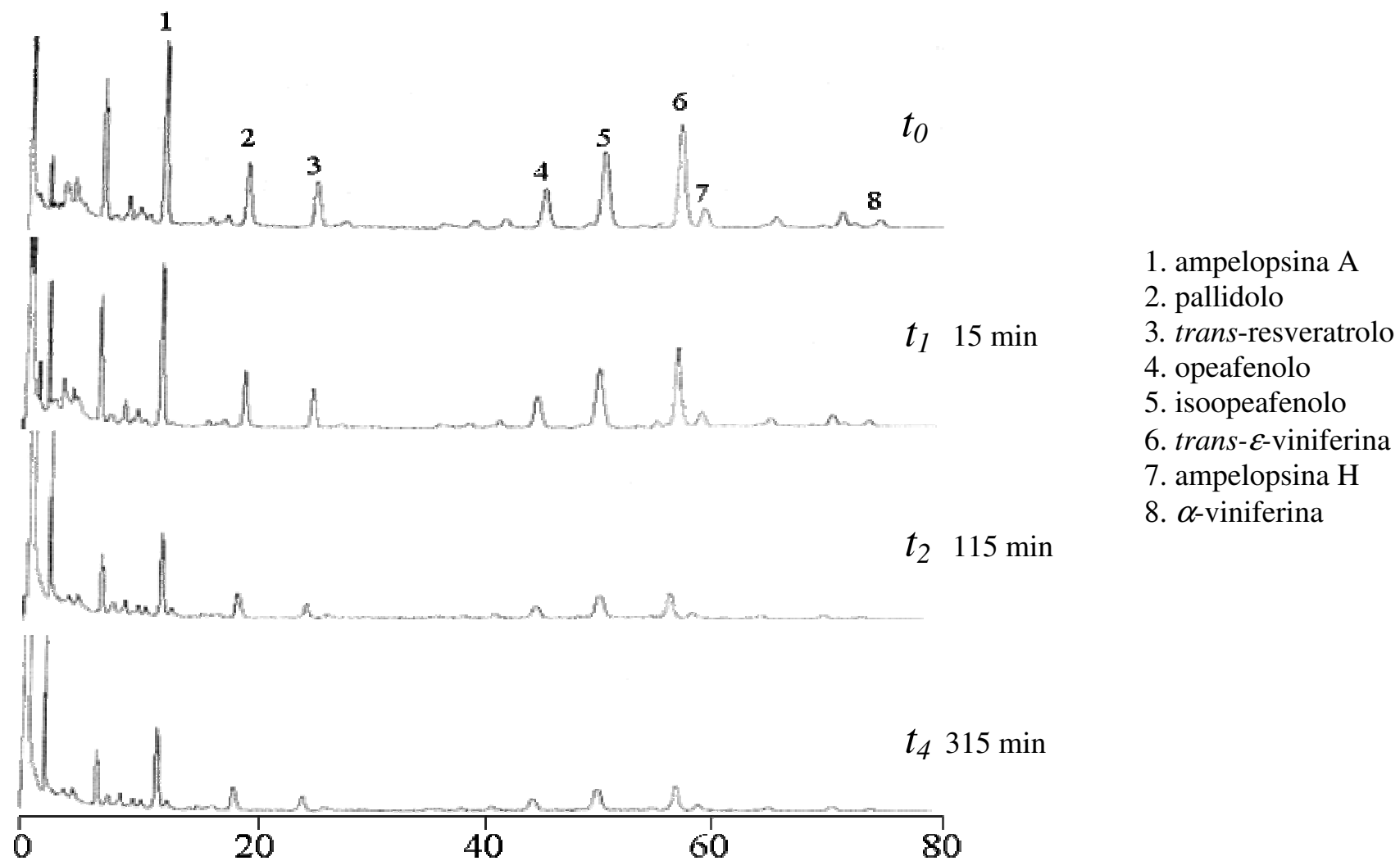
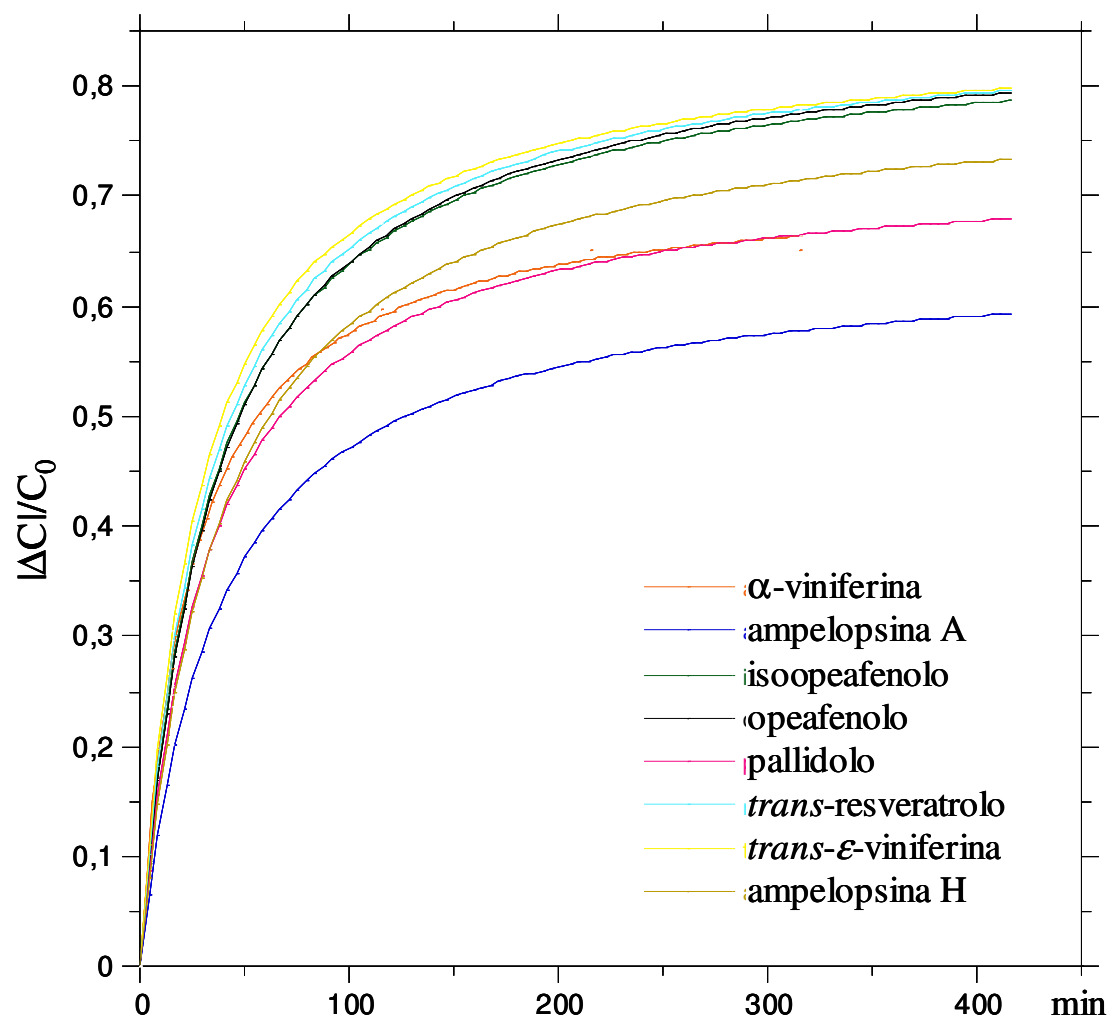


Figura 3.1.25. Cromatogrammi dell'estratto metanolico sottoposto a reazione di Fenton registrati a diversi intervalli di tempo.

imbruniva. Tale soluzione iniettata all'HPLC ha mostrato nel tempo un generale decremento dei picchi cromatografici dei polifenoli identificati e anche della maggior parte degli altri picchi, senza evidente comparsa di nuovi (Fig. 3.1.25). Tuttavia si è osservato un lieve incremento dell'area cromatografica fra 0 e 2.8 min, alla quale possono contribuire composti relativi all'equilibrio del ferro in soluzione, rilevati anche in cromatogrammi di eluizione della soluzione di FeCl₂ al tempo di ritenzione di 1.70 min, e sostanze polari derivanti dalla ossidazione dei componenti dell'estratto metanolico sottoposto a reazione di Fenton. Inoltre si è constatato un accumulo di sostanze nella colonna che venivano eluite solo con percentuali di acetonitrile più elevate di quelle normalmente usate per l'eluizione dell'estratto metanolico, suggerendo anche la formazione di sostanze più lipofile. Il grado di conversione di ciascun polifenolo registrato nel tempo, descritto convenientemente dalla funzione $|\Delta C|/C_0 = mt/(n + t)$, mostra che nessun polifenolo ha raggiunto la conversione totale, il valore medio di conversione fra i polifenoli a 415 min è risultato 0.73 (valori compresi fra 0.80 e 0.59) (Fig. 3.1.26) e dopo 24 h 0.76; tuttavia gran parte della conversione si è osservata nell'arco dei primi 215 min con un valore medio di 0.69, suggerendo che la reazione si svolge essenzialmente nei primi 215 min in quanto solo un 7% dei polifenoli totali viene ulteriormente convertito a 24 h.

La principale reazione con i reattivi di Fenton è: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$. Si ammette che i polifenoli in soluzione acquosa in presenza di specie radicaliche in ambiente acido, come quello in cui si è mantenuta la reazione di Fenton sull'estratto metanolico (pH 5), reagiscano per estrazione diretta dell'idrogeno da un gruppo fenolico, ad esempio in presenza di radicali ossidrilici $ArOH + \cdot OH \rightarrow ArO\cdot + H_2O$, tuttavia è ammessa anche un'addizione preventiva dell' $\cdot OH$ sull'anello aromatico, preferenzialmente in alfa a un ossidril fenolico, che evolve nella eliminazione di H₂O per estrazione dell'H \cdot da un gruppo fenolico dello stesso anello aromatico (Lundqvist e Eriksson, 2000). È da ritenere che tale reazione sui polifenoli interessi prevalentemente quei gruppi fenolici capaci di generare radicali più stabilizzati per risonanza (Fig. 3.1.27). La reazione di formazione di ArO \cdot ha una costante di velocità diretta k che potrebbe essere dell'ordine di $10^8 M^{-1}s^{-1}$, riscontrata per il resveratrolo (Leonard *et al.*, 2003), ma anche più elevata come riportato per altri composti di natura fenolica (Kang *et al.*, 2002; Bonin *et al.*, 2007). I radicali polifenolici così formati in soluzione acquosa non sembrano essere capaci di dare reazioni di propagazione con i polifenoli stessi ma solo di condensazione con altre specie radicaliche polifenoliche con formazione di eteri aromatici e di legami carbonio-carbonio aromatici (Mamedov *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2006).



	V_0^r ($s^{-1} \times 10^4$)	V_0 (M/s)
<i>trans</i> - ϵ -viniferina	5.10	1.46×10^{-7}
α -viniferina	4.93	1.24×10^{-8}
<i>trans</i> -resveratrolo	4.59	7.74×10^{-8}
isoopeafenolo	4.28	5.06×10^{-8}
opeafenolo	4.17	2.37×10^{-8}
pallidolo	3.93	4.38×10^{-8}
ampelopsina H	3.58	2.12×10^{-8}
ampelopsina A	2.90	4.21×10^{-8}

Figura 3.1.26. Curve di conversione delle viniferine contenute nell'estratto metanolico sottoposto a reazione di Fenton e valori di velocità iniziali relative (V_0^r) ed assolute ($V_0 = V_0^r C_0$).

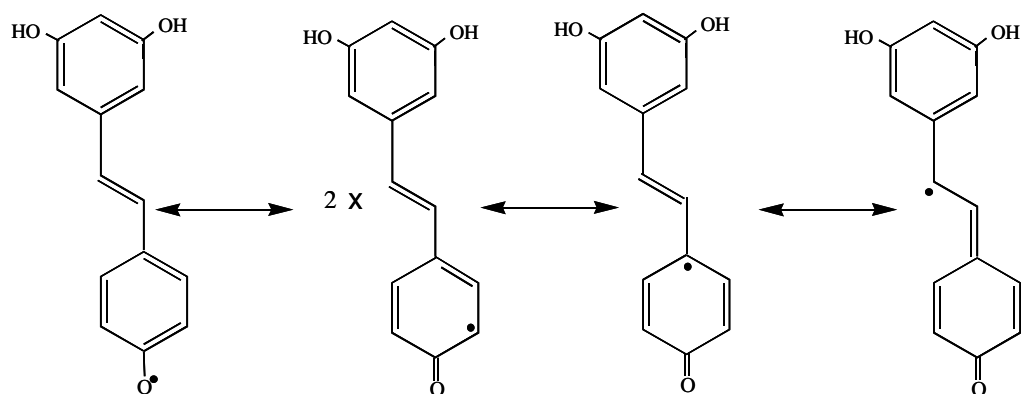


Figura 3.1.27. Uno dei principali fenossi radicali del resveratrolo e sue formule di risonanza.

Lo svolgimento delle reazioni può essere molto diverso per difenoli *orto* e *para* rispetto ai *meta*, per questi ultimi è ammessa una condensazione attraverso difenoli mono-radicali, cioè ad un solo centro di reazione (Mamedov *et al.*, 2005). Tuttavia polifenoli con elevato peso molecolare e numero di gruppi ArOH potrebbero esistere come poliradicali con più di un centro di reazione. Nel caso del resveratrolo e dell' ϵ -viniferina il processo può essere più complesso per la presenza del gruppo vinilico in *para* a un gruppo fenolico, in quanto sono concepibili reazioni radicaliche anche a livello del legame olefinico con possibili condensazioni e formazione di legami carbonio alchilico-carbonio aromatico, anche intramolecolare se, come nell' ϵ -viniferina, vi sono condizioni steriche favorevoli, carbonio alchilico-ossigeno fenolico e carbonio alchilico-carbonio alchilico, in quest'ultimo caso la condensazione non è ossidativa. Il radicale sul legame olefinico del resveratrolo e dell' ϵ -viniferina potrebbe generarsi oltre che per risonanza dei radicali fenossi nell'anello 1,4-sostituito, anche per attacco sul doppio legame di specie radicaliche come ad esempio l' \cdot OH.

Le condensazioni che interessano i carboni aromatici di fenossi radicali in *orto* e *para* ai carboni ossigenati, favoriti dalla risonanza, prevederebbero la migrazione dell'idrogeno di quei carboni sul gruppo fenossi radicale con conveniente ripristino dell'aromaticità (Mamedov *et al.*, 2005). Tali specie condensate sarebbero di nuovo disponibili alla formazione di radicali fenossi per estrazione dell'idrogeno fenolico costituendo di nuovo substrati per la condensazione (Mamedov *et al.*, 2005); inoltre l' $\text{H}\cdot$ piuttosto che migrare potrebbe essere estratto da radicali presenti nell'ambiente di reazione ricostituendo un fenossi radicale. Potrebbe essere significativa, nell'estratto metanolico sottoposto a reazione di

Fenton, l'estrazione dell'H· da parte dei fenossi radicali e del legame olefinico e suoi radicali, poiché il resveratrolo e l'ε-viniferina sono abbondanti. Tuttavia l'H· nelle condensazioni dei carboni aromatici potrebbe essere anche liberato e esistere come tale nell'ambiente di reazione per tempi anche più lunghi dell'·OH avendo paragonabile o minore reattività di quest'ultimo (Buxton *et al.*, 1988).

Fin tanto che nell'ambiente di reazione sono presenti specie capaci di estrarre l'H· dai gruppi fenolici, fondamentalmente l'·OH nella reazione di Fenton, specialmente nelle fasi iniziali, questi processi possono continuare determinando la formazione di radicali polifenolici di varie dimensioni molecolari fino a formare specie macromolecolari; tale processo sarebbe più probabile con l'aumento del peso molecolare per stabilizzazione dei fenossi radicali per ampia delocalizzazione anche di più elettroni spaiati sulla stessa macromolecola.

Nel processo ossidativo con H₂O₂ catalizzato dal Fe²⁺ nella reazione di Fenton (Fenton, 1894) uno schema delle principali reazioni radicaliche coinvolgenti i reagenti può essere quello riportato in Tabella 3.1.11 (Walling e Goosen, 1973; Babbs e Griffin, 1989; Pignatello, 1992; Kang *et al.*, 2002).

Tabella 3.1.11. Reazioni che coinvolgono i reagenti di Fenton e relative costanti di velocità *k*.

	<i>k</i> *		n° reazione
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$	63	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(1)
$\cdot\text{OH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	3.2×10^8	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(2)
$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \cdot\text{OOH} + \text{H}^+$	1.0×10^{-2}	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(3)
$\text{Fe}^{2+} + \cdot\text{OOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^-$	1.2×10^6	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(4)
$\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OOH} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \text{O}_2$	3.1×10^5	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(5)
$\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \cdot\text{OOH}$	2.7×10^7	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(6)
$\cdot\text{OH} + \cdot\text{OO}^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{O}_2$	1.0×10^{10}	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(7)
$2 \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	4.2×10^9	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	(8)

* costanti di velocità tratte da Kang *et al.* (2002).

Le costanti cinetiche di queste reazioni, sono fra 10^{-2} e $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Kang *et al.*, 2002); fra le più lente c'è la stessa reazione di formazione dell'·OH (1) ($k=63 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e fra quelle più veloci la reciproca distruzione dei radicali ossigenati ·OH e ·OO·, (7) e (8). La potenzialità di produrre radicali ·OH e ·OOH dall'H₂O₂ dipende strettamente dalle dinamiche della coppia redox Fe³⁺/Fe²⁺ se il ferro è presente in quantità catalitica. Infatti la reazione (1), che rappresenta la fonte principale di radicali nella reazione di Fenton, necessita della riconversione del ferro nella sua forma ridotta per massimizzare le rese. La riduzione del Fe³⁺ avverrebbe secondo la reazione somma (3) + (5), $2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2$ (Bergendahl *et al.*, 2003), che tuttavia risulta lenta a causa della reazione (3) per cui nell'ambiente di reazione della Fenton la concentrazione del Fe³⁺ prevale su quella del Fe²⁺, tanto più se non intervengono altre fonti di ·OOH che alimentino la reazione (5) o altre reazioni di riciclo. Inoltre tale reazione somma prevede un consumo di H₂O₂ con conseguente resa dei radicali ·OH secondo la (1) pari a non più dei 2/3 dell'H₂O₂ in eccesso rispetto al Fe²⁺, non prendendo in considerazione le rapide reazioni di consumo del radicale (2), (6), (7) e (8), sebbene la (6), una reazione di propagazione radicalica, benché produca ·OOH utili per la riduzione del ferro secondo la (5), determina un bilancio nullo sulla produzione di radicali oltre a perdite di H₂O₂ essendo la reazione somma (5) + (6) $\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$.

Fonti di ·OOH per la rigenerazione del Fe²⁺ secondo la reazione (5) possono anche essere substrati organici (Walling e Goosen, 1973) come ad esempio i radicali fenolici secondo la reazione $\text{ArO}\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{ArOH} + \cdot\text{OOH}$, che potrebbe avere una cinetica rapida (Babbs e Griffin, 1989), il cui effetto, nullo sulla produzione di radicali, è in definitiva quello di tenere in vita la reazione (1) ma con consumo di H₂O₂ e conseguente riduzione della resa finale di ·OH e distruzione dei radicali ArO·.

Il riciclo del Fe²⁺ è ostacolato da specie che nell'ambiente di reazione consumino rapidamente e abbondantemente il radicale ·OOH come accade ad esempio nelle determinazioni di ·OH e ·OOH usando trappole per radicali; ad esempio con concentrazioni elevate di DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-ossido), Yamazaki e Piette (1990) determinano rese di ·OH addirittura inferiori a quella stechiometrica rispetto al Fe²⁺ aggiunto in quantità catalitiche, sebbene gli autori essenzialmente imputino ciò alla formazione, favorita al crescere del rapporto Fe²⁺/H₂O₂, sia di complessi del Fe(II) e Fe(III) intermedi di reazione, che di ossido del Fe(IV) come prodotto; per il rapporto molare H₂O₂/Fe²⁺ adottato (20.9) per l'estratto metanolico si dovrebbe osservare un comportamento analogo a quello rilevato da

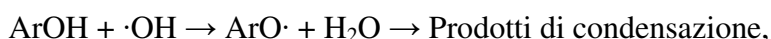
questi autori. Tuttavia l'ambiente di reazione non è stato condizionato da una trappola radicalica poiché l'estratto metanolico, pur ammettendo che abbia comportamento analogo a trappole radicaliche, era a concentrazione bassa rispetto al reagente H_2O_2 .

Altro effetto negativo sul riciclo del Fe^{2+} è una sua ossidazione per altre reazioni. L' $\cdot\text{OOH}$ stesso consuma Fe^{2+} secondo la reazione (4), che tuttavia può essere poco rilevante dopo le fasi iniziali della reazione di Fenton, quando la concentrazione del Fe^{2+} è trascurabile. Anche l'ossigeno disciolto nella miscela di reazione della Fenton può giocare un ruolo importante nella disponibilità del Fe^{2+} , per esempio su un substrato organico: $\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}\cdot$, e quindi $\text{ROO}\cdot + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{ROO}^- + \text{Fe}^{3+}$ (Walling, 1975).

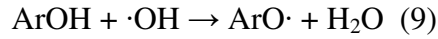
In presenza di complessanti per il ferro incrementerebbe la resa dei radicali $\cdot\text{OH}$ secondo la reazione (1) per diminuzione del potenziale redox della coppia $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (Pierre *et al.*, 2002). Questo potrebbe accadere anche con i costituenti dell'estratto metanolico se abbiano proprietà complessanti. Tuttavia la stabilità maggiore dei complessi del Fe^{3+} rispetto a quelli del Fe^{2+} (Kolthoff *et al.*, 1974) ostacolerebbe il riciclo del Fe^{2+} (Buettner *et al.*, 1983).

Nella reazione di Fenton condotta sull'estratto metanolico, nel rapporto molare Fe^{2+} rispetto ai polifenoli identificati pari a 0.22, la conversione finale osservata dei polifenoli della miscela è molto maggiore di quella stechiometrica rispetto al Fe^{2+} (22%), fra l'altro essi (33% in peso dell'estratto metanolico) non sono l'unico substrato di reazione nella miscela dell'estratto metanolico. Ciò fa supporre che si sia avuto riciclo del ferro, per cui il reagente limitante sarebbe stato l' H_2O_2 . La reazione è stata condotta con un eccesso molare di H_2O_2 pari a 4,6 volte i fenoli identificati, ma la loro conversione parziale può essere dovuta all'ulteriore reazione di H_2O_2 con componenti non identificate della miscela come si evidenzia dalla riduzione anche dei picchi non identificati nel cromatogramma della miscela di reazione (Fig. 3.1.25). In ogni caso le reazioni di consumo dei radicali ossigenati (Tabella 3.1.11) e la stessa reazione di decomposizione dell' H_2O_2 ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$) sono processi che determinerebbero ulteriore perdita di reagente H_2O_2 .

Nel processo di conversione osservato per i vari polifenoli, assumendo l'ipotesi di riciclo del Fe^{2+} , che i polifenoli reagiscano con un unico centro di reazione secondo la reazione:



e che la formazione dei prodotti sia molto più veloce della riconversione di $\text{ArO}\cdot$ in ArOH , quello che è stato osservato sperimentalmente sarebbe essenzialmente la cinetica di conversione della trasformazione:



governata da una costante di velocità diretta k_9 che potrebbe essere dell'ordine di $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Kang *et al.*, 2002). A questa reazione vanno associate quelle relative alla formazione dell' $\cdot\text{OH}$ e del riciclo del Fe^{2+} , ovvero le reazioni (1), (3) e (5) che potrebbero rappresentare le reazioni più significative. La cinetica della conversione della (9) risulterebbe essere allora:

$$d[\text{ArOH}]/dt = -k_9[\text{ArOH}][\cdot\text{OH}] \quad 1$$

che indica la dipendenza dalla $[\cdot\text{OH}]$ che, essendo prodotto dalla reazione (1), sarà strettamente legata alla $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ed alla capacità di rigenerazione del Fe^{2+} essendo questo in quantità catalitiche. Considerando quindi l'equazione cinetica per l' $\cdot\text{OH}$ e imponendo lo stato stazionario per questa specie essendo $k_1 \ll k_9$ (Atkins, 1985):

$$d[\cdot\text{OH}]/dt = k_1[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}] - k_9[\text{ArOH}][\cdot\text{OH}] = 0,$$

si ha:

$$[\text{ArOH}] = k_1/k_9 [\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}]/[\cdot\text{OH}], \quad 2$$

che sostituita nella 1 da:

$$d[\text{ArOH}]/dt = -k_1[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}], \quad 3$$

in cui appare evidente che la velocità di conversione tiene conto della velocità della reazione (1) che effettivamente rappresenterebbe uno stadio lento del processo, tuttavia non appare evidente l'altrettanto stadio lento di riciclo del Fe^{2+} che è presente in quantità catalitiche. L'equazione cinetica per il Fe^{2+} , trascurando la velocità della reazione (4) poiché sia $\cdot\text{OOH}$ che Fe^{2+} si possono supporre in concentrazione molto bassa, è:

$$d[\text{Fe}^{2+}]/dt = k_3[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{3+}] + k_5 [\cdot\text{OOH}][\text{Fe}^{3+}] - k_1[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}] \quad 4$$

in cui appare la $[\cdot\text{OOH}]$ la cui equazione cinetica imponendo lo stato stazionario per questa specie essendo $k_3 \ll k_5$ è:

$$d[\cdot\text{OOH}]/dt = k_3[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{3+}] - k_5 [\cdot\text{OOH}][\text{Fe}^{3+}] = 0,$$

per cui:

$$[\cdot\text{OOH}] = k_3/k_5[\text{H}_2\text{O}_2]$$

che sostituita nella 4 dà una equazione cinetica alla quale può essere imposto lo stato stazionario essendo $k_3 \ll k_1$:

$$d[\text{Fe}^{2+}]/dt = 2k_3[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{3+}] - k_1[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Fe}^{2+}] = 0;$$

per cui:

$$[\text{Fe}^{2+}] = 2k_3/k_1[\text{Fe}^{3+}] \quad 5$$

che mostra come la $[\text{Fe}^{2+}]$ si mantiene bassa e direttamente proporzionale alla $[\text{Fe}^{3+}]$.

Considerando il bilancio di massa del ferro:

$$[\text{Fe}^{2+}] + [\text{Fe}^{3+}] = C_0^{\text{Fe}} \quad 6$$

e risolvendo il sistema delle equazioni 5 e 6, esplicitando per la $[\text{Fe}^{3+}]$ si ha:

$$[\text{Fe}^{3+}] = k_1 C_0^{\text{Fe}} / (k_1 + 2k_3)$$

che sostituita nella 3 da:

$$d[\text{ArOH}]/dt = - 2k_1k_3 C_0^{\text{Fe}} / (k_1 + 2k_3) [\text{H}_2\text{O}_2] \quad 7$$

tenuto conto ancora che $k_3 \ll k_1$, l'equazione 7 può essere approssimata a:

$$d[\text{ArOH}]/dt = - 2k_3 C_0^{\text{Fe}} [\text{H}_2\text{O}_2] \quad 8$$

in cui si evidenzia che nelle condizioni non di eccesso del substrato rispetto all' H_2O_2 e catalitiche per il Fe^{2+} la reazione è del primo ordine sia rispetto alla concentrazione totale del ferro che dell' H_2O_2 e indipendente dalla concentrazione del substrato; essa è governata dalla costante cinetica del riciclo del Fe^{2+} secondo la reazione lenta (3) che ne condiziona l'efficienza.

Tuttavia quando la reazione di Fenton è stata condotta sull' ϵ -viniferina ($C_0=1.14$ mM) raccogliendo i dati di conversione a tempi più ravvicinati, a partire dal primo punto a 1.17 min si può supporre che tutto il Fe^{2+} sia stato consumato essendo già la conversione del substrato superiore a quella stechiometrica rispetto al Fe^{2+} e la reazione procederebbe in regime di riciclo per il Fe^{2+} . Quindi assumendo come stato iniziale quello a 1.17 min, come t_0 , e alla concentrazione in quell'istante dell' ϵ -viniferina $C_{1.17}$, il grafico della conversione risulta essere quello in Figura 3.1.28. La velocità iniziale risulta valere 7.1×10^{-6} M/s, mentre la velocità calcolata secondo la 8, assumendo $[\text{H}_2\text{O}_2] \approx C_0^{\text{H}_2\text{O}_2}$, risulterebbe invece 1.6×10^{-8} M/s, essendo $C_0^{\text{H}_2\text{O}_2} = 4.17$ mM e $C_0^{\text{Fe}^{2+}} = 0.2$ mM. Pertanto risulta evidente che la reazione di riciclo del Fe^{2+} è molto più veloce e probabilmente dipende da altre reazioni.

La rigenerazione del Fe^{2+} può essere governata da specie polifenoliche, ad esempio polifenoli con gruppi OH in posizioni *orto* e *para* (Kang *et al.*, 2002) hanno potenziali redox vicini a quelli del $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ giustificati dalla forte stabilità della struttura chinonica derivante dalla loro ossidazione. Nel caso specifico potrebbero essersi comportati in maniera analoga i polifenoli come il resveratrolo e l' ϵ -viniferina, aventi unità viniliche in *para* al gruppo fenolico, e le strutture macromolecolari in formazione per condensazione dei polifenoli, che permettendo una forte delocalizzazione del radicale possono intervenire nella riduzione diretta del Fe^{3+} a Fe^{2+} per formazione di strutture semichinoniche stabili.

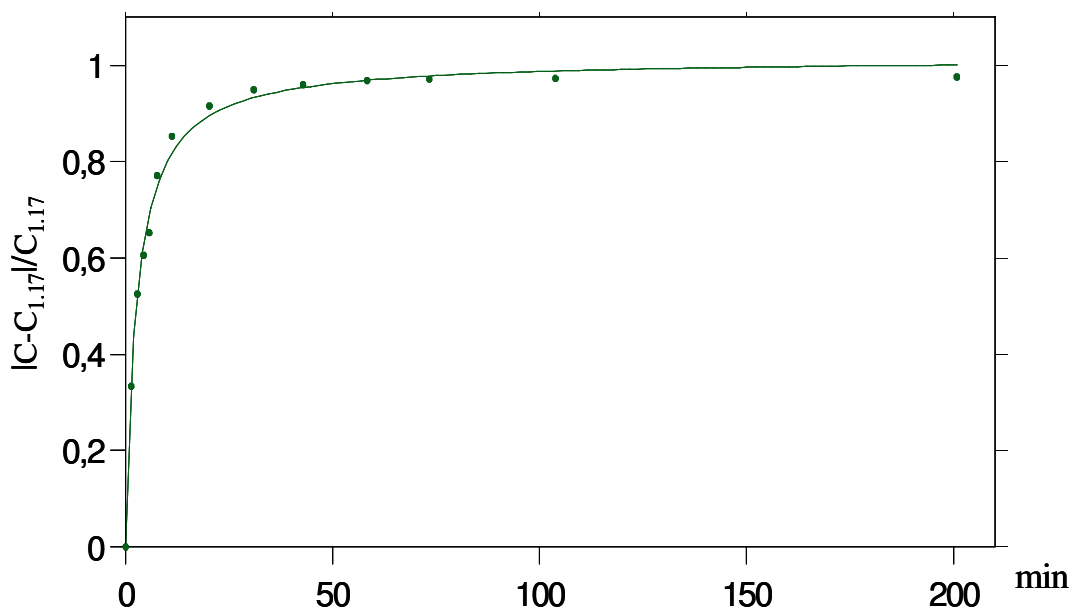


Figura 3.1.28. Curva di conversione dell' ϵ -viniferina sottoposta a reazione di Fenton a partire dalle condizioni di riciclo del Fe^{2+} .

Le differenze nelle conversioni dei vari polifenoli isolati al procedere della reazione di Fenton (Figura 3.1.26) suggeriscono una loro diversa velocità relativa di reazione con le specie radicaliche ossigenate. Tali differenze si evidenziano fra alcuni polifenoli verso il massimo di conversione, sebbene fino a 115 minuti si assista a qualche inversione degli andamenti delle curve dovuta probabilmente all'errore sperimentale.

L'interpretazione delle differenti conversioni osservate può essere spiegata in base ai principi generali della stabilità relativa dei radicali e della probabilità che le molecole possano reagire avendo potenzialmente un numero diverso di centri di reazione essendo diverso il numero di gruppi fenolici. Tuttavia va ricordato che molecole polifenoliche ad elevato peso molecolare potrebbero reagire con più centri di reazione formando radicali multipli e che le cinetiche delle reazioni radicaliche possono essere regolate dal regime diffusivo (Buxton *et al.*, 1988).

La reattività è più elevata per l' ϵ -viniferina e il resveratrolo che possono formare un radicale fenolico sull'anello *para*-sostituito maggiormente stabilizzato per coniugazione con il legame olefinico (Fig. 3.1.27), seguono i tetrameri, con maggiore reattività per l'elevato numero di gruppi fenolici per unità molecolare, quindi il trimero α -viniferina e il dimero pallidolo, che hanno lo stesso numero di OH fenolici, e infine il dimero ampelopsina A, col

minore numero di gruppi fenolici per unità molecolare. La minore reattività dell'ampelopsina H, rispetto all'oepafenolo ed all'isooepafenolo può essere imputata alla possibilità di formare sugli OH degli anelli *meta*-ossisostituiti radicali stabilizzati per risonanza sui carboni quaternari carbonio sostituiti presenti nello stesso anello aromatico, che sono in numero diverso nelle specie considerate; oepafenolo ed isooepafenolo presentano più diffusamente questa condizione di stabilizzazione rispetto all'ampelopsina H pur essendo tutte e tre le molecole con lo stesso numero di gruppi OH (Fig. 3.1.1).

A partire dalla dimerizzazione $2\text{ArO}\cdot \rightarrow (\text{ArO})_2$, i polifenoli nell'ambiente di reazione saranno soggetti a successive reazioni di condensazione poiché ogni prodotto di esse rappresenta ancora substrato, di diversa reattività, per la reazione di Fenton, generando strutture macromolecolari. Il processo avrebbe una cinetica complessa per l'evoluzione dei substrati di partenza variabili istante per istante per dimensione, numero di centri di reazione e diffusività. Sebbene la macromolecolarizzazione porti a un aumento di centri di reazione e tendenzialmente a una maggiore reattività rispetto ai polifenoli di partenza, nello stesso tempo le macromolecole potrebbero raggiungere condizioni di impedimenti sterici (Mamedov *et al.*, 2005), di rapida e ampia delocalizzazione degli elettroni spaiati e ridotta diffusività, per cui l'ulteriore condensazione sarebbe meno probabile.

L'analisi elementare dell'estratto metanolico del legno sintomatico dopo reazione di Fenton (Tabella 3.1.12) mostra rispetto a quello non reagito un incremento dei contenuti percentuali di ossigeno ed azoto, e decremento dei contenuti percentuali di carbonio e idrogeno. Tenendo conto che dopo la reazione si avevano perdite pari al 6% della massa della miscela posta a reagire, probabilmente per mineralizzazione di parte di essa, il bilancio di perdite dei vari elementi mette in evidenza che sostanzialmente sono stati allontanati solo carbonio ed idrogeno, essendo la perdita di ossigeno e l'incremento di azoto nei limiti dell'errore della determinazione. Il non allontanamento dell'azoto in seguito alla reazione di Fenton suggerisce che sia coinvolto in strutture difficilmente mineralizzabili. La perdita di idrogeno è più del doppio di quella del carbonio suggerendo che i prodotti di reazione hanno subito condensazione ossidativa.

Tabella 3.1.12. Percentuali in peso di C, H, O, N nell'estratto metanolico tal quale e dopo reazione di Fenton e relative perdite percentuali dopo la reazione.

	estratto metanolico tal quale	Estratto dopo reazione di Fenton	[†] perdita % dopo reazione di Fenton
C	51.6	50.2	8.55
H	5.60	4.76	20.1
N	0.95	1.06	-4.9
O*	41.8	44.0	1.05

* L'ossigeno è stato calcolato per differenza.

[†] Perdita = $(E_i^{iq} - 0.94E_i^F) * 100 / E_i^{iq}$ essendo il residuo dopo reazione di Fenton il 94% dell'estratto metanolico iniziale; E_i^{iq} e E_i^F sono le % dell'elemento iesimo dell'estratto metanolico tal quale e dopo reazione di Fenton, rispettivamente.

In Figura 3.1.29 sono mostrati gli spettri FT-IR dell'estratto metanolico prima e dopo reazione di Fenton. Nello spettro IR dell'estratto metanolico dopo reazione di Fenton (Figura 3.1.29b) la banda dell'aromatico a 1611 cm^{-1} risulta più intensa rispetto alle altre dell'aromatico a 1514 e 1448 cm^{-1} di quanto non sia nello spettro dell'estratto metanolico non reagito (Figura 3.1.29a). Ciò può essere dovuto ad un aumento della sostituzione e delocalizzazione elettronica degli anelli aromatici dovuta alla condensazione dei polifenoli (Bellamy, 1975). Sono evidenti nello spettro del prodotto di reazione le maggiori intensità delle bande centrate a 1380 cm^{-1} degli OH e 1243 cm^{-1} essenzialmente dei C-O (Bellamy, 1975) di gruppi fenossi, probabilmente dovute rispettivamente all'aumento degli OH carbossilici, come evidenziato anche dalla banda a 1715 cm^{-1} , e alla formazione di ulteriori eteri aromatici per condensazione dei polifenoli. Nelle zone dello spettro da circa 1200 a 650 cm^{-1} alcuni picchi possono essere attribuiti agli assorbimenti dei CH aromatici (Bellamy, 1975), essi divengono meno intensi e numerosi nello spettro dell'estratto dopo reazione di Fenton per la diminuzione del numero di legami CH sugli aromatici a causa della condensazione.

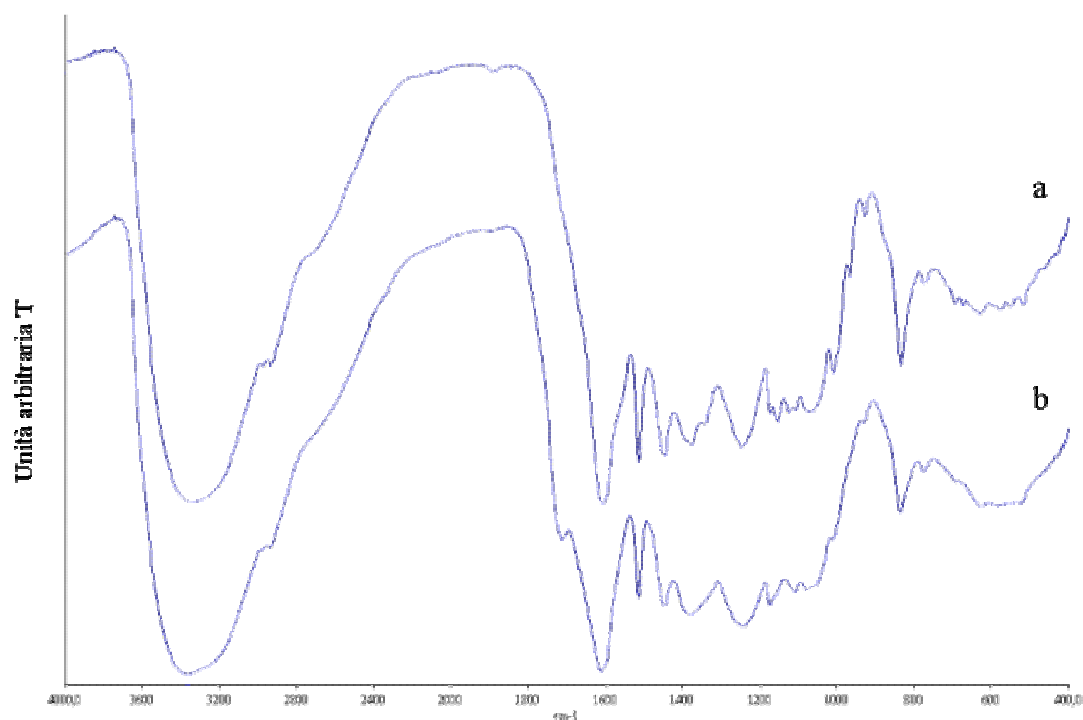


Figura 3.1.29. Spettri FT-IR dell'estratto metanolico tal quale (a) e dopo reazione di Fenton (b).

Sia l'estratto metanolico che il suo prodotto dalla reazione di Fenton mostrano un contenuto di ossigeno particolarmente elevato (Tabella 3.1.12). Il rapporto C/O molare 1.6 dell'estratto non reagito, piuttosto che suggerire la presenza di strutture aromatiche tetraossigenate, poco probabili viste le caratteristiche fin'ora accertate dei polifenoli identificati, indica la presenza di strutture alcoliche alifatiche confermate anche dalla forte intensità nello spettro IR (Fig. 3.1.29a) della banda fra 1000 e 1100 cm^{-1} attribuibile a C-O di alcoli primari e secondari. Ciò potrebbe essere giustificato dalla presenza di strutture glicosilate come i piceidi (Soleas *et al.*, 1997; Cichewicz e Kouzi, 2002) o residui ligninici legati a gruppi glicosidici derivanti dall'alterazione del legno, coestratti con i polifenoli in metanolo. Tali composti potrebbero essere quelli che determinano i numerosi picchi cromatografici a tempi di ritenzione bassi non ancora identificati (Fig. 3.1.24) nell'eluizione dell'estratto. Dopo la reazione di Fenton la perdita del 6% della massa può essere imputata essenzialmente alla mineralizzazione di specie non aromatiche contenute nella miscela quali proprio i residui glicosidici che residuerebbero in parte anche in forma ossidata come si rileva dalla banda a 1715 cm^{-1} dei gruppi carbossilici (Fig. 3.1.29b), questi ultimi renderebbero congrua la perdita prevalente di carbonio ma non di ossigeno (Tab. 3.1.12). Inoltre

l'alterazione di tali specie glicosidiche contribuirebbe alla diminuzione delle intensità dei picchi a 1007, 966, 931, e 835 cm^{-1} , dei segnali tipici dei gruppi piranosidici dei carboidrati (Rao, 1963), registrata nello spettro dell'estratto metanolico dopo reazione di Fenton.

Il frazionamento per dimensioni molecolari (Tabella 3.1.13) mostra un arricchimento di sostanze con pesi molecolari superiori a 10,000 Dalton e fra 10,000 e 3,000 Dalton (circa 23%) nei prodotti della reazione di Fenton rispetto all'estratto metanolico non reagito (2.4%). L'ammontare della percentuale della frazione condensata ha un valore simile a quella dei polifenoli identificati convertiti (22% dell'estratto metanolico), ciò suggerisce che questi ultimi siano stati quelli che principalmente hanno generato questa frazione condensata.

Tabella 3.1.13. Frazionamento per pesi molecolari apparenti (Dalton) dell'estratto metanolico del legno sintomatico tal quale e dopo reazione di Fento (%).

	>10000	10000-3000	<3000
estratto metanolico	0.64	1.8	97.6
estratto metanolico dopo reazione di Fenton	17.2	5.4	77.4

Lo spettro IR della frazione di peso molecolare minore di 3,000 Dalton del prodotto di reazione (Figura 3.1.30c) mostra le stesse caratteristiche dello spettro dell'intero prodotto di reazione (Figura 3.1.29b) ma con intensità superiori dei picchi fra 1100 cm^{-1} e circa 740 cm^{-1} , ciò suggerisce che in questa frazione sono presenti oltre ai polifenoli non reagiti, le specie fenoliche glicosilate, queste potrebbero avere avuto difficoltà a dare condensazione ossidativa (Kirk *et al.*, 1980) avendo i gruppi OH impegnati nei legami glicosidici. Più intensa è anche la banda intorno a 1380 cm^{-1} che confermerebbe la maggiore presenza di gruppi OH alcolici e carbossilici dovuti ai gruppi glicosidici, anche ossidati, come confermato dalla maggiore intensità della banda a 1714 cm^{-1} dei COOH.

Lo spettro IR della frazione fra 3,000 e 10,000 Dalton (Figura 3.1.30b) mostra molto intensi i segnali attribuibili a specie alcoliche intorno a 1100 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} , mentre sono meno intensi i segnali dei polifenoli descritti prima per il prodotto non frazionato. Ciò lascia intendere che questa sia una frazione derivante dalla scarsa condensazione di specie polifenoliche glicosilate.

Infine nello spettro IR della frazione maggiore di 10,000 Dalton (Figura 3.1.30a) sono essenzialmente assenti i segnali attribuiti alle specie glicosidiche e risultano evidenti le caratteristiche dei polifenoli condensati quali l'intensa banda a 1258 cm^{-1} , che è stata attribuita alla formazione di legami eterei dovuti alla condensazione dei polifenoli confermata dalla riduzione dei segnali dei CH aromatici nella zona da 1100 cm^{-1} a 650 cm^{-1} . Tale frazione appare pertanto essere stata originata essenzialmente dalla condensazione dei soli polifenoli.

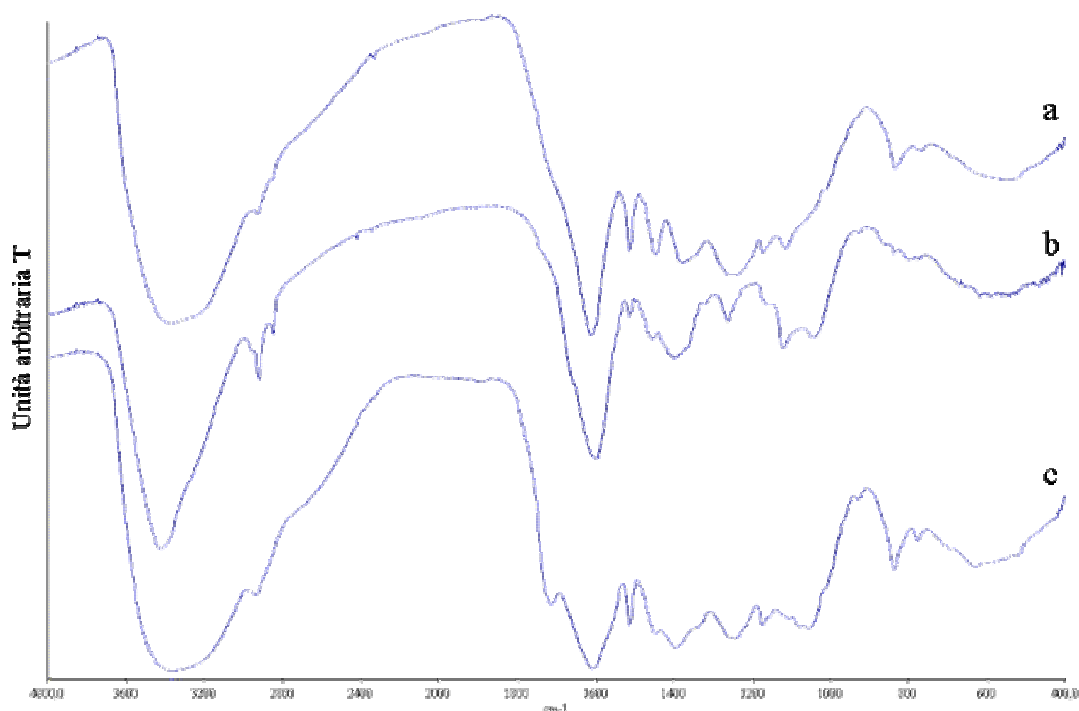


Figura 3.1.30. Spettri FT-IR delle frazioni di diverso peso molecolare dell'estratto metanolico dopo reazione di Fenton: (a)>10,000 Da; (b)<10,000 Da e >3,000 Da; (c)<3,000 Da.

Il prevalere nei prodotti di reazione delle dimensioni molecolari superiori a 10,000 Dalton su quelle tra 10,000 e 3,000 Dalton (Tab. 3.1.13) suggerisce che le specie condensate nel corso della reazione di Fenton costituiscono un substrato preferenziale rispetto ai polifenoli precursori, in quanto capaci di formare radicali con maggiore stabilità per delocalizzazione di elettroni spaiati e potendo anche comportarsi da specie a più centri di reazione amplificando la probabilità di reagire tra loro e incrementando rapidamente il peso molecolare. Pertanto l'incompleta conversione dei polifenoli dipenderebbe, oltre che dai motivi detti prima, anche dal crescente consumo nel corso della reazione dell' H_2O_2 per il

substrato macromolecolare, e l'ulteriore loro condensazione potrebbe quindi essere ottenuta solo con un sufficiente eccesso di H₂O₂.

Prodotti della reazione di Fenton su resveratrolo ed ϵ -viniferina

Nella reazione di Fenton condotta sull'estratto metanolico, specie di condensazione a basso peso molecolare dovrebbero essere state prodotte solo inizialmente. Infatti dopo un minuto di reazione su quantità cospicue di resveratrolo e di ϵ -viniferina, i cromatogrammi delle miscele di reazione presentano numerosi picchi (Figura 3.1.31) alcuni dei quali ai tempi di ritenzione delle molecole identificate. Per il resveratrolo è apparso un picco di bassissima intensità al tempo di ritenzione della (+)-*trans*- ϵ -viniferina, probabilmente corrispondente al racemo (\pm)-*trans*- ϵ -viniferina in quanto poco probabile una reazione stereospecifica. Per l' ϵ -viniferina, posta a reagire in miscela *cis* e *trans*, sono apparsi picchi ai tempi di ritenzione dell'ampelopsina A e dell'opeafenolo. Queste attribuzioni dei picchi cromatografici sono state confermate per coiniezione con le sostanze pure. Nei cromatogrammi appaiono evidenti altri picchi, alcuni dei quali coincidenti con quelli dell'estratto metanolico di sostanze ancora non indagate. La maggior parte delle sostanze prodotte sono poco ritenute in colonna, suggerendo che esse siano più polari di quelle di partenza. Per il resveratrolo possono esservi stati prodotti derivanti dalla condensazione anche di radicali generati dal metanolo (Buxton *et al.*, 1988) presente in soluzione. Degno di nota è che nei prodotti della Fenton dall' ϵ -viniferina appaia rilevabile solo l'opeafenolo ma non l'isoopeafenolo suggerendo stereospecificità della reazione di condensazione. D'altra parte reazioni della (+)- ϵ -viniferina con perossidasi da rafano hanno mostrato la formazione prevalente di (+)-opeafenolo rispetto al (-)-isoopeafenolo con rese del 9.4 e 1.2 %, rispettivamente (Takaya *et al.*, 2002).

Riproducendo su quantità più esigue la reazione di fenton sull' ϵ -viniferina e seguendo il processo a tempi ravvicinati a distanza di circa 1.2 min si osserva che i picchi di ampelopsina A ed opeafenolo raggiungono un massimo a 2.5 e 1.2 min, rispettivamente, e successivamente tracce di ampelopsina A residuano in quantità decrescenti fino a circa un'ora di reazione, mentre l'opeafenolo scompare a circa 9 min, ciò è in accordo con l'osservazione che nell'estratto metanolico sottoposto a reazione di Fenton l'opeafenolo risultava a rapida scomparsa mentre l'ampelopsina A si trasformava più lentamente. Non è da escludere che gli accumuli di queste sostanze nei primi minuti siano influenzati dal bilancio fra quantità sintetizzate e demolite dal primo istante di reazione.

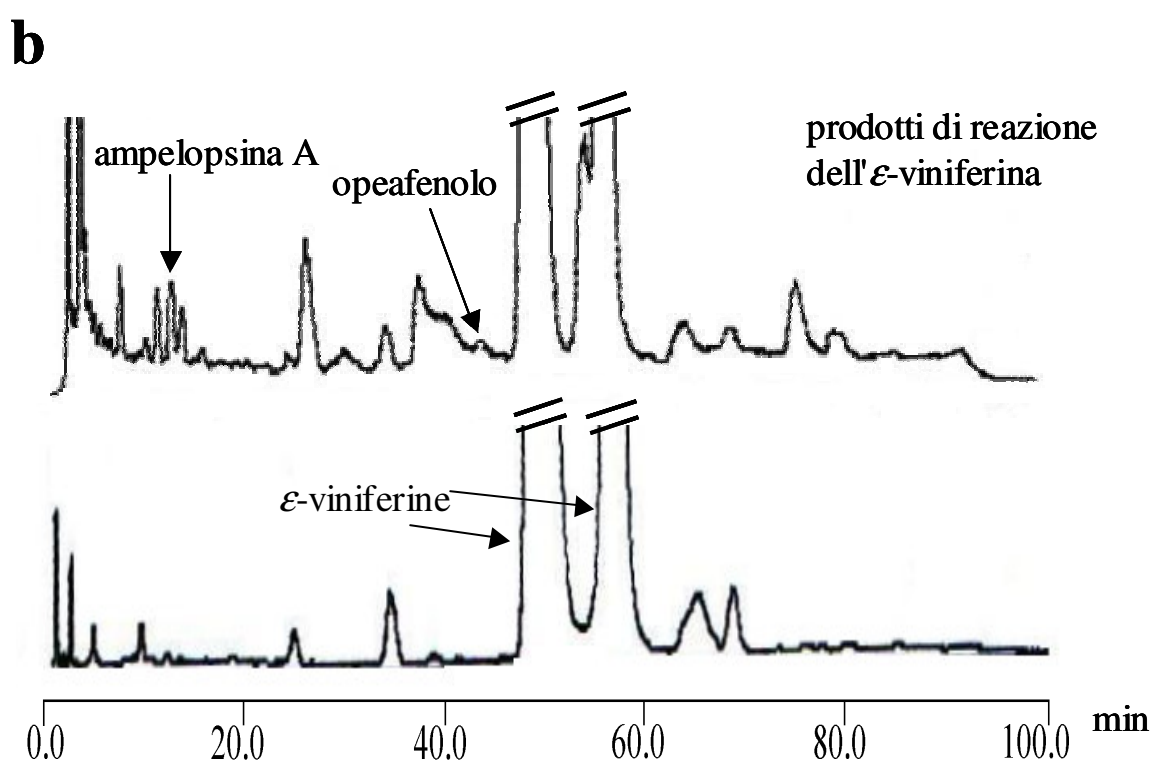
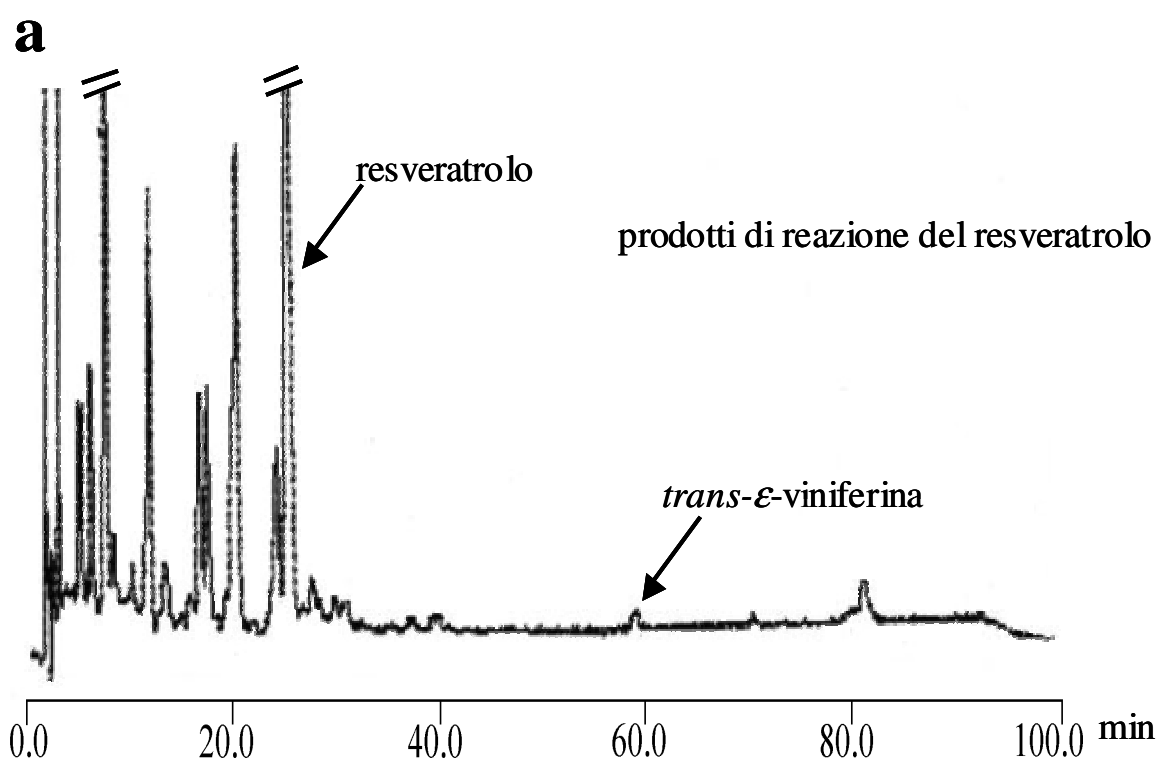


Figura 3.1.31. Cromatogrammi relativi alle reazioni di Fenton condotte su resveratrolo (**a**) ed ϵ -viniferina (**b**) ed arrestate dopo 1 minuto.

Discussione

L'accumulo più elevato delle fitoalessine nella zona bruno-rossa del tronco invasa principalmente da Pch e Pal (Mugnai *et al.*, 1999), rispetto alle porzioni asintomatiche, è indicativo di una forte risposta localizzata dell'ospite contro i patogeni, sebbene anche nelle zone asintomatiche potrebbe essersi verificato un incremento dei contenuti endogeni di questi metaboliti indotto per via sistemica (Langcake e McCarty, 1979).

L'imbrunimento del legno può essere la conseguenza di fenomeni ossidativi condotti dai ROI in risposta allo stress biotico tipici della PCD per l'arginamento dell'espansione dei funghi (Deacon, 2000), anche se gli stessi funghi potrebbero contribuire alla produzione di H_2O_2 (Mason *et al.*, 2003). Tuttavia i funghi dell'esca Pch e Pal potrebbero aver rilasciato precursori DHN melaninici (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000) determinando la formazione di composti bruni (Butler e Day, 1998; Bruno e Sparapano, 2006). Le caratteristiche di questi metaboliti fungini possono far ipotizzare una loro capacità di operare come agenti riducenti di specie redox come il ferro e come complessanti (Di Marco *et al.*, 2001) permettendo l'attivazione di reazioni tipo Fenton (Goodell *et al.*, 1997; Bruno e Sparapano, 2006), agendo come si ipotizza per i funghi brown rot. Tuttavia la capacità riducente dei metaboliti secondari dei funghi Pch e Pal *in vivo* non è mai stata indagata. In questo contesto risulta molto probabile che siano stati coinvolti antiossidanti come le viniferine essendo risultate tutte sensibili all'attacco di radicali ossigenati nella reazione di Fenton condotta *in vitro*.

Le concentrazioni di H_2O_2 (4.5 mM) adottate nella reazione *in vitro* potrebbero essere comparabili, se non inferiori, a quelle prodotte nei tessuti legnosi nelle condizioni di stress dovute all'infezione da patogeni dell'esca. Per esempio è stato riscontrato che nelle sezioni di stelo di *Zinnia elegans* nella fase di lignificazione dei tessuti dello xilema si possono raggiungere concentrazioni di H_2O_2 di 5-10 mM nell'intorno dei vasi xilematici (Ros-Barcelo *et al.*, 2002); fra l'altro il processo di produzione di H_2O_2 nelle cellule xilematiche in lignificazione viene suggerito avere non solo il ruolo di attivazione delle perossidasi per la polimerizzazione dei monomeri ligninici nell'apoplasto ma anche un ruolo di regolazione della morte programmata per la differenziazione delle cellule xilematiche (Ros-Barcelo *et al.*, 2002). Non è da escludere che anche nel caso della risposta ossidativa determinata dallo stress biotico l' H_2O_2 agisca nell'apoplasto dove i polifenoli di risposta dovrebbero trovare il luogo di maggiore produzione (Dixon e Paiva, 1995) sebbene vengano segnalate perossidasi per la sintesi delle viniferine anche a livello dei vacuoli (Cichewicz e Kouzi, 2002). Inoltre le zone

intercellulari sono quelle che per prime vengono raggiunte dalle ife fungine (Feliciano e Gubler, 2001) che potrebbero contribuire alla formazione di H_2O_2 (Deacon, 2000). Tuttavia, tenuto conto che alle già citate concentrazioni volumetriche corrisponde un contenuto di H_2O_2 pari a circa $1.3 \mu\text{mol/g}$ di legno (Ros-Barcelo *et al.*, 2002), e valutazioni del contenuto di ferro totale nel legno bruno-rosso, d'altra parte non dissimili da quello sano, sono di circa $0.287 \mu\text{mol/g}$ di legno (Amalfitano, dati non pubblicati), si avrebbe un rapporto molare H_2O_2/Ferro nei tessuti legnosi pari a 4.53. Tale rapporto sarebbe più basso di quello adottato nella reazione di Fenton condotta *in vitro* (20.9), ma è difficile pensare che tutto il ferro dei tessuti legnosi si renda disponibile per la reazione di Fenton anche se a tale reazione possono concorrere altre specie redox metalliche presenti nei tessuti. Inoltre la quantità di H_2O_2 prodotta nello stress biotico potrebbe essere superiore e prolungata nel tempo rispetto a quella nel processo di lignificazione. Pertanto si può ipotizzare che l' H_2O_2 , costantemente prodotta in risposta allo stress biotico, e la successiva produzione di polifenoli innescherebbero un processo ossidativo radicalico supportato anche da una normale dotazione di ferro nel legno e catalizzato dagli stessi polifenoli che rigenererebbero il Fe^{2+} come si è ipotizzato nella Fenton condotta *in vitro*. Tuttavia alla rigenerazione del Fe^{2+} contribuirebbero altre fonti di $\cdot\text{OOH}$, secondo la reazione (5), quali ad esempio le NADPH ossidasi che negli stress biotici sono pensate essere fortemente attive sulla parete (Mittler, 2002). Le quantità accumulate di polifenoli identificati nel legno bruno-rosso (3.4%), che fra l'altro potrebbero non essere tutti quelli effettivamente estratti dal legno, sono in quantità tale da determinare un rapporto con gli accumuli di acqua ossigenata citati in precedenza da Ros-Barcelo *et al.* (2002) molto maggiore rispetto a quello della reazione *in vitro*, e quindi tali fenoli potrebbero comportarsi da trappola per i ROI limitando il riciclo del Fe^{2+} . Tuttavia si può supporre che il processo si svolga *in vivo* condizionato da regimi diffusivi che possono determinare una minore disponibilità dei fenoli alla reazione di Fenton rispetto a quella in soluzione degli esperimenti *in vitro*. Tale processo potrebbe permettere la condensazione dei polifenoli fino al raggiungimento della deposizione di materiali polimerici che determinerebbero l'isolamento della zona di reazione del legno (Pearce, 2000) contribuendo alla morte programmata delle cellule. Essendo scarso l'effetto antifungino di questi polifenoli contro i funghi dell'esca come *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, (Amalfitano *et al.*, 2005), l'effetto della rapida produzione di questi polifenoli (Amalfitano *et al.*, 2003) sarebbe essenzialmente di produrre una barriera fisica all'intromissione dei patogeni rallentandone l'espansione. In ogni caso tale processo dovrebbe essere contestualizzato nella complessa

risposta ossidativa e tenere conto delle altre specie fortemente reattive che si determinano nei tessuti, non ultima la produzione di NO, specie molto reattiva nelle reazioni radicaliche che concorre fortemente alla risposta negli stress biotici (Grant e Loake, 2000; Mittler, 2002) e che potrebbe essere stata intrappolata dai polifenoli come è suggerito anche dai contenuti rilevanti di azoto nell'estratto metanolico.

Gli esperimenti condotti sui polifenoli resveratrolo e l' ϵ -viniferina sottoposti a reazione di Fenton suggeriscono che la risposta ossidativa può contribuire alla formazione di almeno alcune delle viniferine identificate. Ciò è abbastanza plausibile in quanto nei prodotti della Fenton condotta *in vitro* sono stati formati composti come l'opeafenolo e l'ampelopsina A, quest'ultima specie più ossidata di quanto prevedibile in una condensazione ossidativa del resveratrolo, che sono fra l'altro quelli maggiormente accumulati nel legno bruno-rosso rispetto al sano. La stessa ampelopsina B, non rilevata nel legno sano, anch'essa una molecola non di semplice polimerizzazione ossidativa del resveratrolo per la presenza di un carbonio metilenico, potrebbe essere un prodotto della reazione di Fenton sui polifenoli in cui è stato intrappolato un radicale H \cdot , anche se nella reazione di Fenton condotta su resveratrolo ed ϵ -viniferina *in vitro* non è stata rilevata poiché potrebbe essere scarsa la sua formazione.

3.2 ANALISI DEI LEGNI

Analisi chimiche

Le analisi chimiche dei legni bruno-rosso (BR), con strie nere (SN) e asintomatico (A) sono riportate in Tabella 3.2.1. Tutti i legni mostrano meno dell'1% di estratto in etere di petrolio. L'estratto metanolico è più abbondante nei legni sintomatici, in particolare nel legno bruno-rosso. L'estratto metanolico contiene polifenoli come resveratrolo, ϵ -viniferina (Amalfitano *et al.*, 2000) e molti altri oligomeri del resveratrolo (paragrafo 3.1), fitoalessine prodotte dal genere *vitis* in risposta a stress di vario tipo (Cichewicz and Kouzi, 2002) che si accumulano nell'area di infezione del tronco (Amalfitano *et al.*, 2000). L'estratto in ossalato è minore nel legno bruno-rosso, ciò suggerisce che quest'ultimo contiene meno sostanze idrosolubili costituenti i tessuti vivi, visto che in esso vi è una comparabile quantità di sostanze pectiche rispetto al legno asintomatico. La frazione pectica, biancastra per i legni asintomatico e con striature nere, come usualmente sono le pectine, per il legno bruno-rosso appariva di colore bruno in soluzione acquosa. Questa soluzione estratta con acetato di etile rimaneva colorata e rendeva solo il 4.4% di estratto organico lasciando ritenere che tali sostanze non erano assimilabili a semplici pectine. Il più alto contenuto di pectine appare nel legno con striature nere, ciò potrebbe essere dipeso dalla presenza di vasi occlusi da materiale pectico prodotto dalla pianta in risposta all'attacco dei funghi (Rioux *et al.*, 1998). Sia i contenuti di emicellulose che di cellulosa sono più bassi nei legni malati, in particolare nel legno bruno-rosso. In tale legno è ridotto soprattutto il contenuto di emicellulose, come evidenziato anche dal rapporto cellulosa/emicellulose più alto. Il contenuto più alto di residuo ligninico appare nei legni malati, in particolare nel bruno rosso.

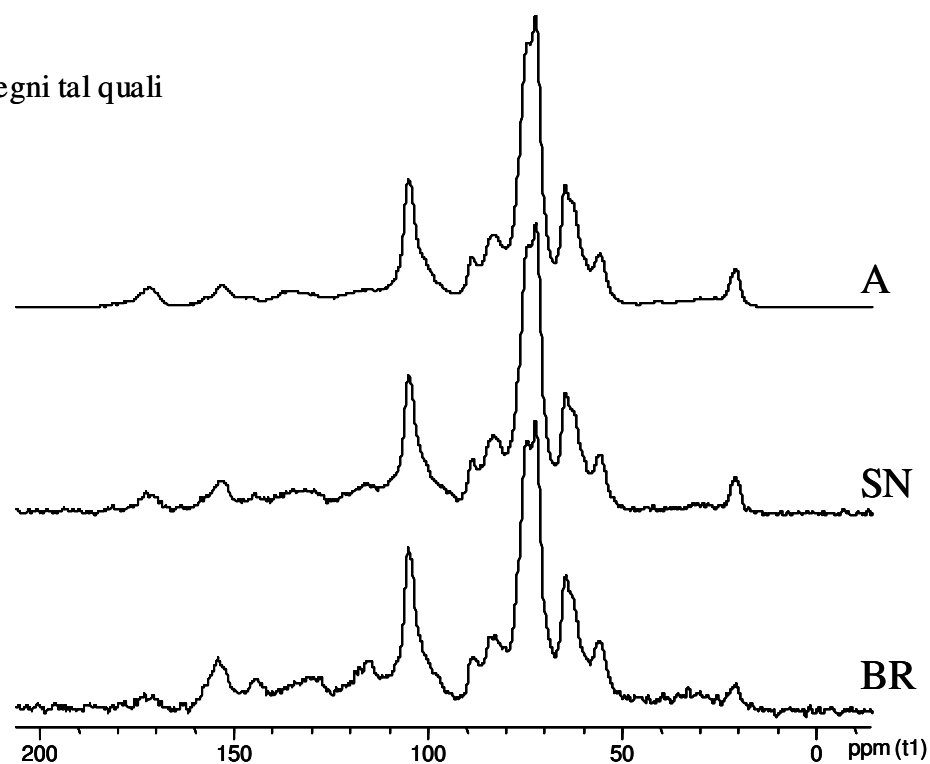
Tabella 3.2.1. Composizione dei legni (%).

	asintomatico	con strie nere	bruno-rosso
estratto in etere di petrolio	0,7	0,8	0,5
estratto metanolico	5,6	6,7	6,9
estratto in ossalato	15,8	12,3	7,0
sostanze pectiche	2,8	5,1	3,2
emicellulose	20,3	19,1	14,3
cellulosa	45,4	43,8	41,4
cellulosa/hemicellulosa	2,2	2,3	2,9
residuo ligninico	12,1	17,2	29,9

Analisi spettroscopiche NMR ^{13}C CP-MAS e FT-IR dei legni

Tutti gli spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui appaiono simili qualitativamente ma con lievi differenze di intensità relative tra i vari picchi (Figura 3.2.1). In tutti gli spettri sono predominanti i segnali dei carboni polisaccaridici di cellulosa, emicellulose e pectine nell'intervallo 112-59 ppm, che si sovrappongono ai segnali di alcuni carboni aromatici protonati della lignina, nell'intervallo 112-94 ppm, e ai carboni sp^3 eterei ed alcolici delle catene laterali della lignina nell'intervallo 94-59 ppm. Il segnale tra 196 e 166 ppm è attribuibile a carboni dei gruppi $\text{COO}(\text{H,R})$, principalmente quelli acetilici delle emicellulose, che può essere sottostimato a causa della bassa risposta strumentale dei carboni quaternari. I segnali tra 166 e 112 ppm sono attribuibili ai carboni aromatici ligninici protonati, C-sostituiti o ossigenati. Il segnale a 56 ppm è attribuibile principalmente a OCH_3 e $\text{C}\beta\text{-C}$ della lignina. Il segnale a 21 ppm è attribuibile principalmente al CH_3 acetilico delle emicellulose.

a: legni tal quali



**b: residui dopo estrazione
con etere di petrolio**

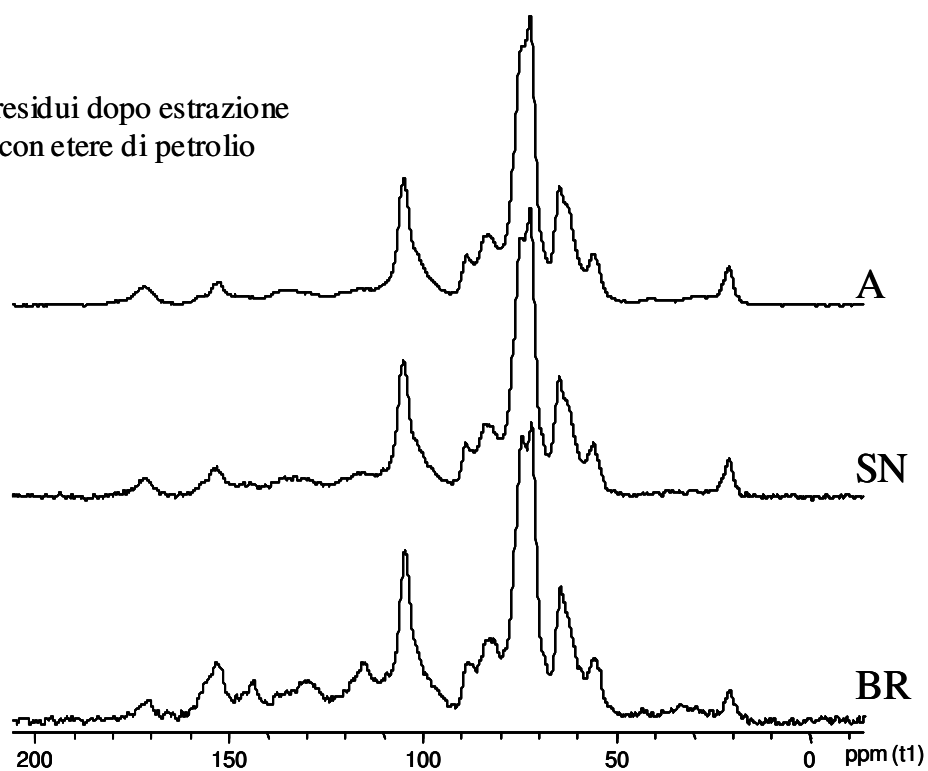


Figura 3.2.1. Spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui.
A: asintomatico; SN: con strie nere; BR: bruno-rosso

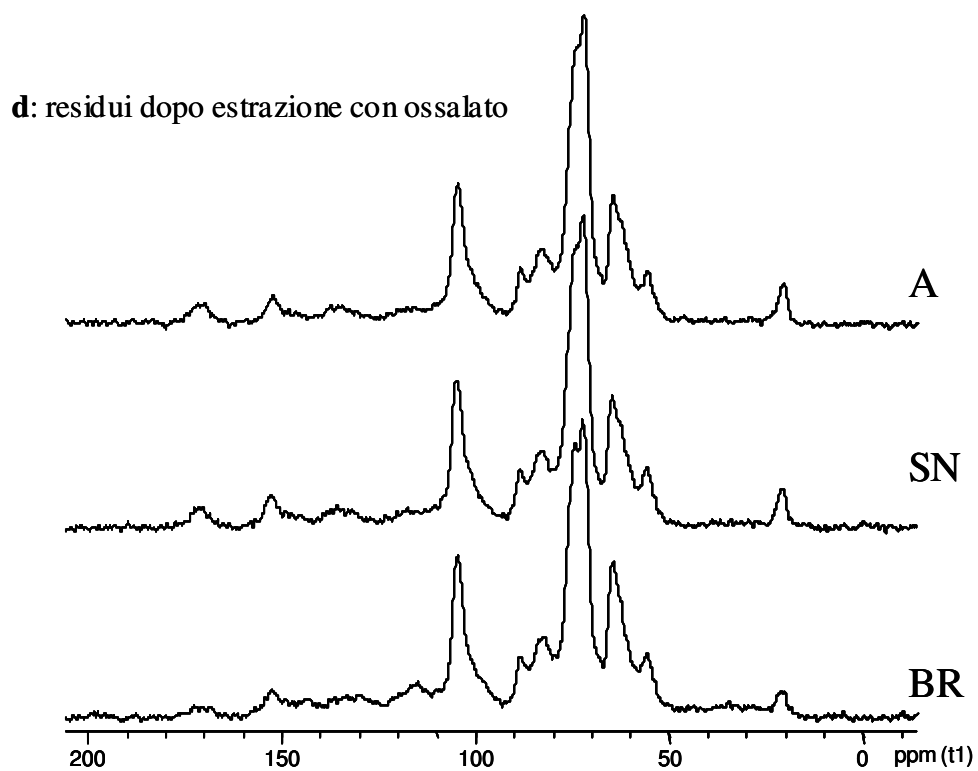
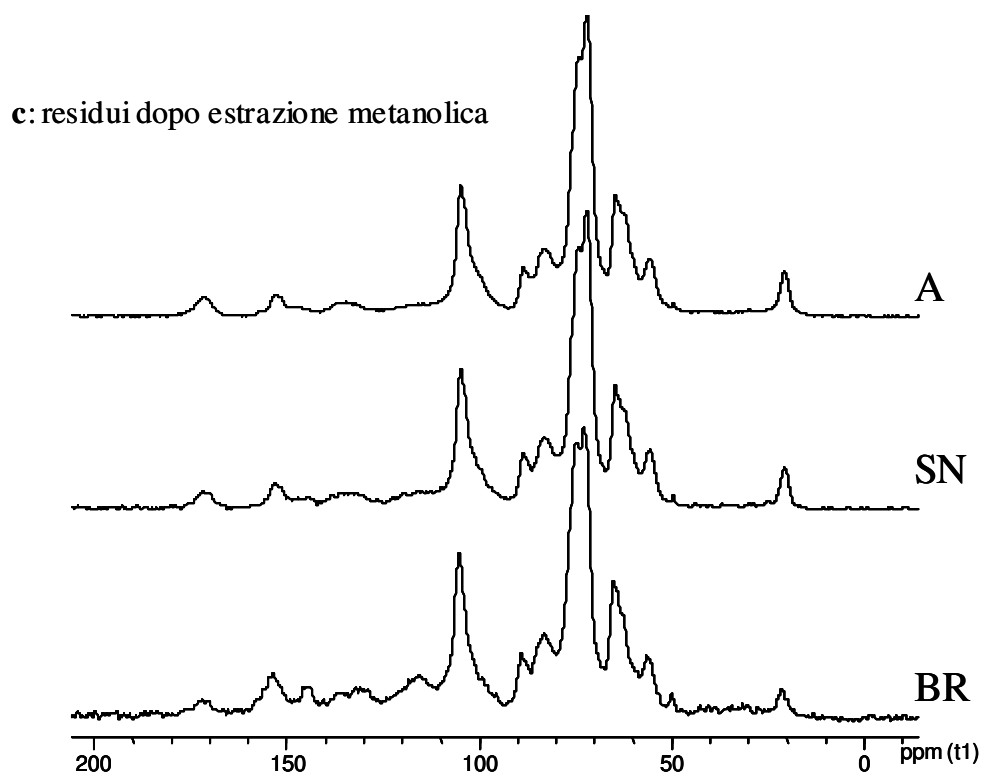


Figura 3.2.1. Spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui.
A: asymptomatico; SN: con strie nere; BR: bruno-rosso

e: residui dopo idrolisi con H_2SO_4 0.5 M

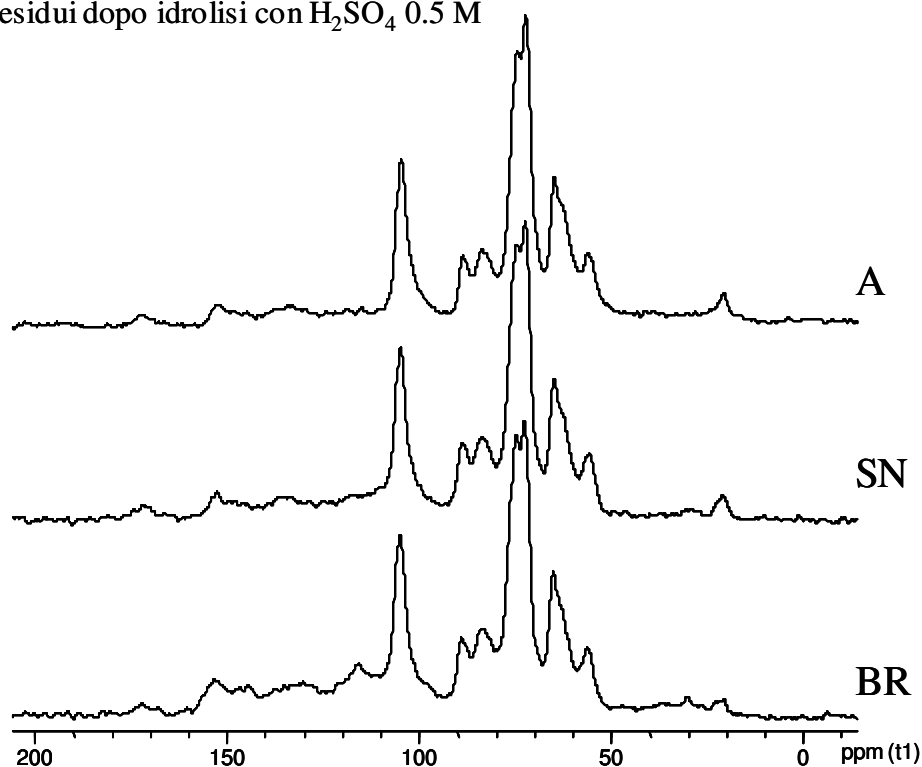


Figura 3.2.1. Spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui.
A: asintomatico; SN: con strie nere; BR: bruno-rosso

Le integrazioni degli spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui ad ogni stadio di estrazione ed idrolisi (Tabella 3.2.2) mostrano che il contenuto di carbonio arilico totale e delle sue frazioni, aril-O(H,R) ed aril-(H,R), e il carbonio $\text{Csp}^3\text{-O(H,R)}$, essenzialmente attribuibile alle catene laterali della lignina, sono più alti nei legni malati, particolarmente per il legno bruno-rosso. Invece il carbonio carboidratico totale mostra un andamento opposto.

Il segnale a 56 ppm non mostra evidenti diminuzioni rispetto ai trattamenti, suggerendo che la maggior parte di questo segnale derivi da OCH_3 e $\text{C}\beta\text{-C}$ della lignina.

L'integrazione di tutti gli spettri dei residui dei legni dopo estrazione con etere di petrolio non hanno mostrato significative differenze rispetto ai legni di partenza.

Tabella 3.2.2. Analisi strutturale NMR ^{13}C CP-MAS dei legni e dei loro residui dopo i trattamenti di estrazione e idrolisi (%).

A: legno asintomatico; SN: legno con striature nere ; BR: legno bruno-rosso.

Trattamenti	Tipi di legni e loro residui	-COO(H,R)	Aril-O(H,R)	Aril-(H,R)	Arile totale	C _{sp3} -O(H,R)	Carboidrati	Cellulosa crist./amorf.	OCH ₃ +Cβ-C	Alchili totali	CH ₃ acetilico
nessuno	A	2,6	4,0	11,7	15,7	6,5	65,1	50,0	4,6	5,5	3,2
	SN	2,6	5,9	16,0	21,9	8,6	58,3	47,8	4,6	4,0	2,4
	BR	1,4	9,1	21,9	31,0	10,3	48,3	48,5	4,8	4,1	1,6
estrazione con etere di petrolio	A	2,7	4,2	11,9	16,1	6,5	64,0	50,7	4,6	6,1	3,1
	SN	2,3	5,4	15,6	21,0	8,1	59,6	50,7	4,3	4,6	2,1
	BR	1,8	9,0	22,0	31,0	10,0	48,5	46,6	4,3	4,4	1,8
estrazione con metanolo	A	1,6	2,8	8,6	11,4	4,5	72,3	46,1	5,4	4,9	3,2
	SN	1,4	3,5	11,1	14,6	5,4	70,7	49,4	5,0	2,8	2,4
	BR	1,4	6,9	17,9	24,9	8,0	58,5	48,6	4,4	2,8	1,5
estrazione con ossalato d'ammnio	A	2,1	3,4	10,4	13,9	5,4	71,1	47,4	4,6	2,9	2,4
	SN	2,1	4,4	11,6	15,9	6,1	66,7	50,7	5,1	4,1	2,1
	BR	1,3	4,9	15,5	20,4	6,5	59,9	54,0	5,2	6,7	2
idrolisi con H ₂ SO ₄ 0,05 M	A	2,2	4,1	12,2	16,3	6,8	64,2	59,9	5,9	4,6	1,4
	SN	1,2	4,4	15,1	19,5	7,4	63,1	71,8	5,1	3,7	1,7
	BR	1,5	6,8	20,8	27,6	9,0	52,7	67,2	4,5	4,7	1,5

Per tutti i legni il carbonio carboidratico totale aumenta dopo estrazione metanolica a causa dell'estrazione di polifenoli, come indicato dall'abbassamento degli aril-O e degli aril-(H,R). Tale perdita è più incisiva nei legni sintomatici in accordo con il maggiore estratto metanolico di natura polifenolica (Tab. 3.2.1). La riduzione del COO(H,R) dopo estrazione metanolica, specialmente per i legni asintomatico e con striature nere, suggerisce la maggior presenza di specie carbossiliche estraibili in questi legni piuttosto che nel legno bruno-rosso.

Nel residuo dall'estrazione con ossalato si registra un decremento del carbonio carboidratico totale nel legno asintomatico e particolarmente in quello con strie nere, rispetto ai residui dell'estrazione con metanolo, in accordo con i relativi contenuti di pectine risultati dalle analisi chimiche. L'aumento del COO(H,R) registrato per questi ultimi legni potrebbe essere attribuito a residui di acido ossalico nei campioni. Per il legno bruno rosso dopo estrazione con ossalato il carbonio carboidratico aumenta leggermente, mentre si assiste ad una riduzione dell'aromaticità contrariamente a quanto accade nei legni asintomatico e con strie nere. Ciò può essere dovuto al fatto che le sostanze pectiche estratte si accompagnano a strutture aromatiche che potrebbero aver impresso in queste sostanze il colore bruno osservato. Infatti mentre gli spettri FT-IR delle sostanze pectiche dei legni asintomatico e con strie nere mostrano solo i segnali dei carboidrati, quello delle sostanze pectiche del legno bruno-rosso anche dopo estrazione con acetato di etile mostra segnali fenolici (1603 , 1514 e 1446 cm^{-1} degli anelli aromatici, 1383 cm^{-1} e 1259 cm^{-1} rispettivamente di OH e C-O di gruppi fenossi) insieme a quelli caratteristici dei carboidrati (1148 , 1072 , circa 1050 cm^{-1} dei C-O degli alcoli secondari e 962 cm^{-1} del metilene terminale dei carboidrati, che sono presenti come picchi o spalla) (Figura 3.2.2). Ciò lascia ritenere che le sostanze pectiche del legno bruno-rosso siano intimamente legate a strutture fenoliche. In queste sostanze non è da escludere che siano presenti, o siano esclusivamente, frammenti polisaccaridici di altre strutture della parete legati a residui ligninici o a polifenoli di risposta, poiché la banda dei gruppi carbossilici delle pectine (1728 cm^{-1}), visibile negli spettri di quelle dei legni asintomatici e con strie nere, non risulta evidente nello spettro delle sostanze pectiche del legno bruno-rosso.

Per tutti i legni il carbonio carboidratico diminuisce ulteriormente dopo idrolisi con H_2SO_4 0.05 M per l'allontanamento delle emicellulose, la cui rimozione è anche confermata dall'abbassamento registrato del contenuto di carbonio acetilico. Comunque la persistenza del segnale del carbonio acetilico nel residuo suggerisce un non totale allontanamento delle emicellulose. Gli spettri FT-IR degli estratti in acetato di etile degli idrolizzati in H_2SO_4 0.05

M dei legni asintomatico e con strie nere (circa l'1% di ciascun legno) (Figura 3.2.3), mostrano segnali a 1739 e 1716 cm^{-1} dei legami esterei degli acetili e dei feruloili, circa 1611 e 1514 cm^{-1} degli anelli aromatici, 1216 cm^{-1} dei C-O di gruppi fenossi, 1117 e 1049 cm^{-1} dei C-OH alcolici e a 1264 e 1034 cm^{-1} degli OCH_3 (Gol'man e Reznikov, 1974). Tali caratteristiche possono essere ascritte a feruloil carboidrati derivanti dall'esterificazione dell'acido ferulico con le emicellulose (Ishii, 1997). Nello spettro FT-IR dell'estratto in acetato di etile dell'idrolizzato con H_2SO_4 0.05 M del legno bruno-rosso restano la gran parte dei segnali presenti negli analoghi estratti degli altri due legni, ma non risultano evidenti quelli del metossile, suggerendo che il feruloile ha subito demetilazione nel legno bruno-rosso. Inoltre tale spettro mostra più intense le bande a 1216 e 1613 cm^{-1} e la comparsa di una banda a 1706 cm^{-1} , che suggeriscono la presenza di ulteriori specie fenossi-carbossiliche che potrebbero derivare dall'idrolisi dei legami esterei dei feruloili, d'altra parte una attività tannasica di Pch e Pal è stata dimostrata verso gallotannini (Bruno e Sparapano, 2006).

Negli spettri NMR ^{13}C CP-MAS alla rimozione delle emicellulose corrisponde anche un netto aumento del rapporto cellulosa cristallina su amorfa, tale rapporto risulta più alto per i residui dei legni bruno-rosso e con strie nere lasciando ritenere che in questi legni sia stata deteriorata la frazione non cristallina della cellulosa.

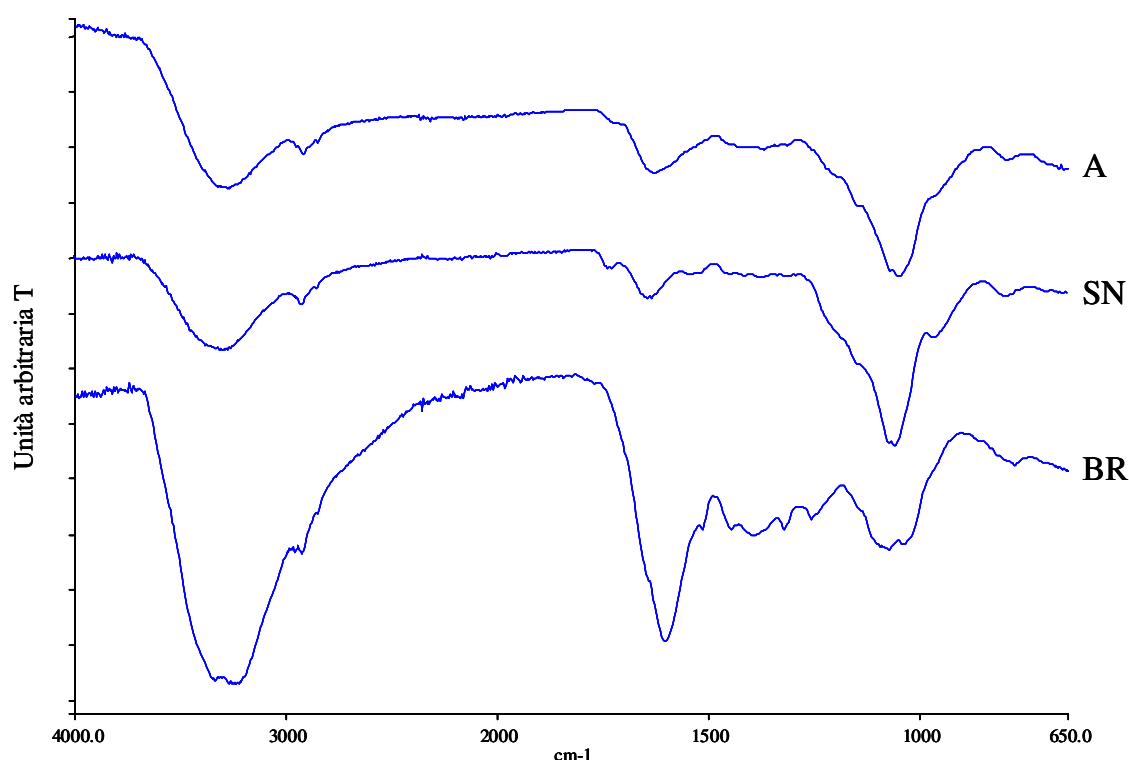


Figura 3.2.2. Spettri FT-IR delle sostanze pectiche estratte dai legni asintomatico (A), con strie nere (SN) e bruno-rosso (BR).

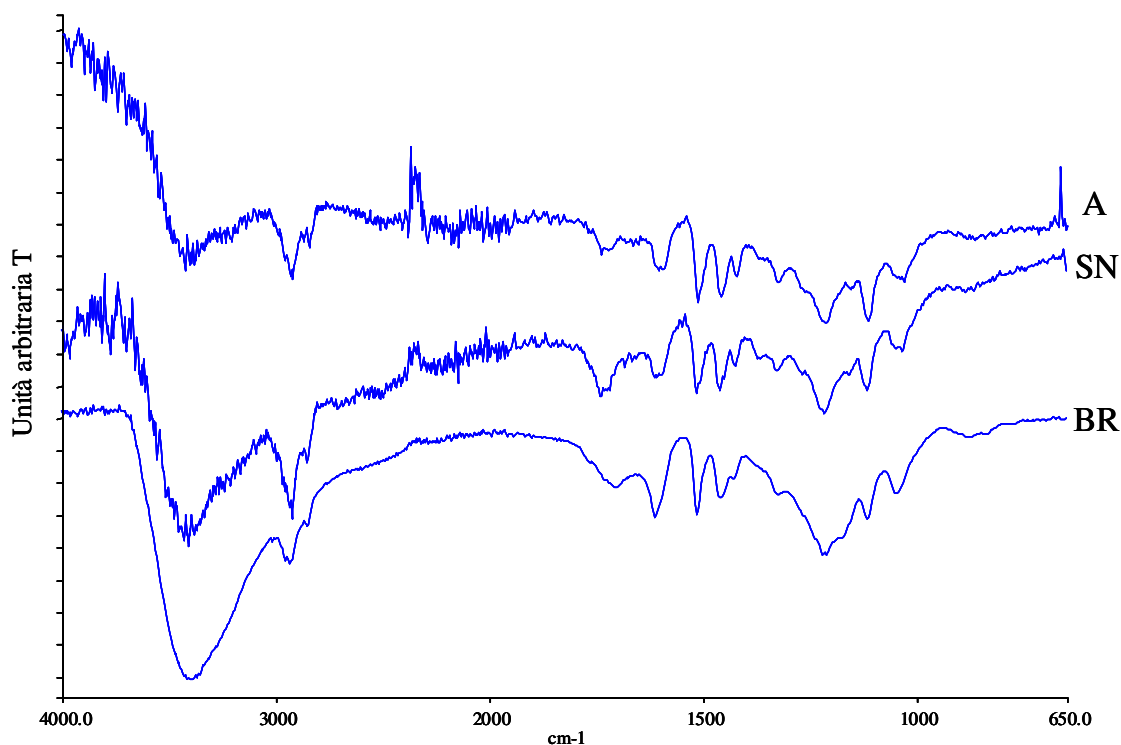


Figura 3.2.3. Spettri FT-IR degli estratti in acetato di etile degli idrolizzati in H_2SO_4 0.5 M dei legni asintomatico (A), con strie nere (SN) e bruno-rosso (BR).

Analisi spettroscopiche NMR ^{13}C CP-MAS dei residui ligninici

Le caratteristiche degli spettri di tutte le lignine sono molto simili ma differiscono per intensità dei segnali (Figura 3.2.4). Tali segnali sono attribuibili ai carboni aromatici ossigenati (166-141 ppm); a quelli aromatici protonati, C-sostituiti e C4-O del siringile (141-97 ppm); ai carboni delle catene laterali della lignina $\text{C}\alpha\text{-O}$, $\text{C}\beta\text{-O}$ e $\text{C}\gamma$ eterei (97-59 ppm, $\text{C}\gamma$ alcolico a 60 ppm); ai carboni metossilici della lignina e $\text{C}\beta\text{-C}$ delle catene laterali (56 ppm); ai carboni alchilici e alcuni $\text{C}\beta\text{-C}$ delle catene laterali (56-0 ppm); è presente anche un debole segnale del carbonio carbossilico (196-166 ppm) (Wilson, 1987).

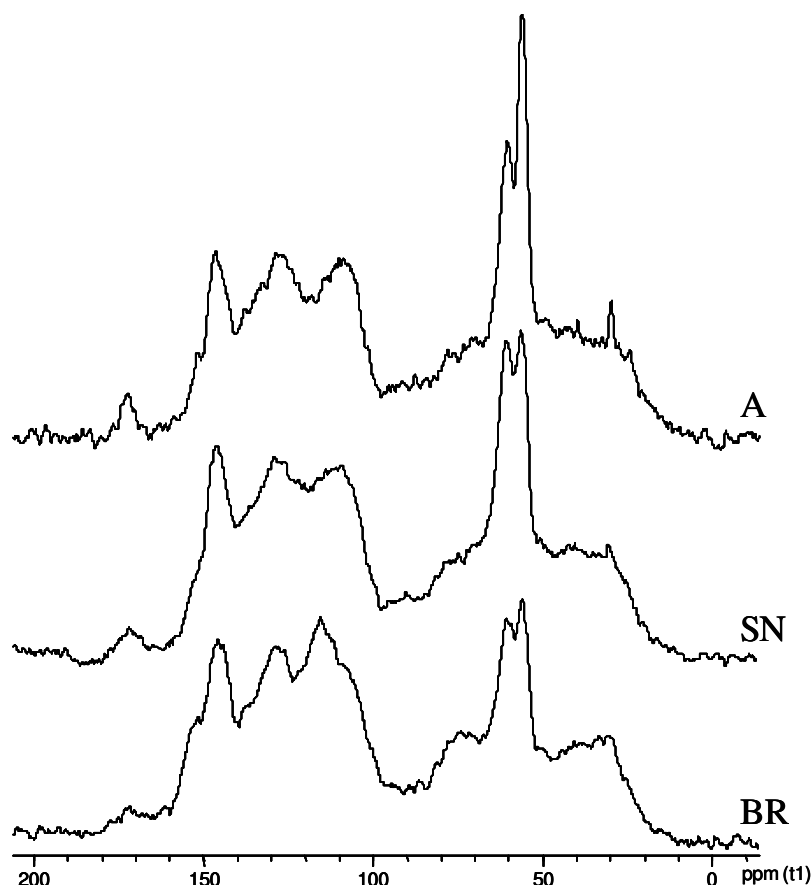


Figura 3.2.4. Spettri NMR ^{13}C CP-MAS dei residui ligninici dei legni asintomatico (A), con strie nere (SN) e bruno-rosso (BR).

In Tabella 3.2.3 sono riportati i contributi percentuali delle strutture costituenti le lignine ricavati dalle integrazioni degli spettri secondo queste attribuzioni. Nella lignina del legno asintomatico il rapporto aril-O/arile totale (24.1%) risulta particolarmente basso per una lignina di una angiosperma, in cui sono presenti essenzialmente guaiacile e siringile (Browning, 1967), per la quale il rapporto sarebbe intorno al 33% per le caratteristiche delle assegnazioni dei segnali delle unità strutturali costituenti la lignina (Figura 3.2.5) negli intervalli di integrazione adottati. Ciò può essere spiegato se nella lignina di vite ci sia una presenza non trascurabile delle unità paraiddrossifeniliche. D'altra parte altri autori hanno rilevato, con studi condotti per demolizione della lignina, la presenza di unità strutturali da riferirsi fondamentalmente al guaiacile e paraiddrossifenile solamente, e un basso contenuto di metossili (Bezhuashvili *et al.*, 1993). Infatti nella lignina del legno asintomatico il rapporto $\text{OCH}_3/\text{aryl-O}$ (32.1%) e quello $\text{OCH}_3/\text{arile}$ totale (7.7%) sono bassi, tanto da far escludere la presenza di siringile, sebbene questi valori sono sicuramente più bassi di quelli reali per la

Tabella 3.2.3. Analisi strutturale NMR ^{13}C CP-MAS dei residui ligninici dei legni asintomatico (A), con strie nere (SN) e bruno-rosso (BR) (%).

Lignine	-COOH	Aril-O(H,R)	Aril-(H,R)			Arile totale	Aril-O/Arile	C _{sp3} -O(H,R)			C _{sp3} -O(H,R)/Arile	OCH ₃	C β -C	OCH ₃ /Arile	OCH ₃ /Aril-O	Alchile
			141-118	118-97	totale			C α -O+C β -O	C γ -O	totale						
A	1,5	11,2	19,3	16,0	35,3	46,5	24,1	11,6	9,6	21,2	45,6	3,6	7,6	7,7	32,1	19,6
SN	1,3	12,1	19,9	16,9	36,9	49,0	24,8	12,1	9,6	21,7	44,3	2,8	7,1	5,7	23,1	18,0
BR	1,7	15,1	20,7	19,1	39,7	54,9	27,6	12,3	7,8	20,1	36,6	1,7	6,2	3,1	11,3	15,3

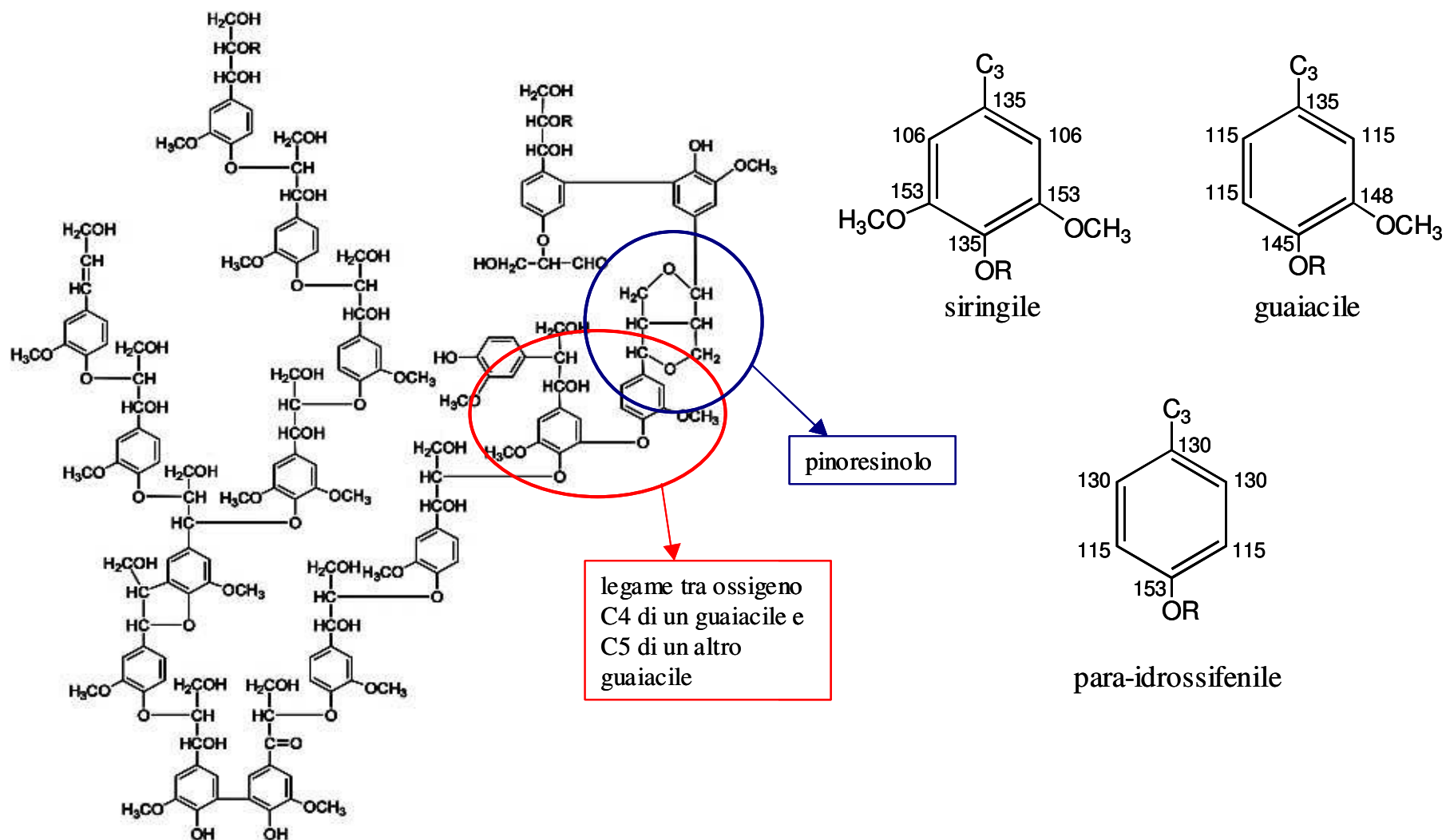


Figura 3.2.5. Modello di struttura ligninica e attribuzioni ^{13}C NMR delle unità monomeriche della lignina (da Wilson, 1987).

sottostima dei metossili nel calcolo effettuato avendo ammesso che tutto il C β -C risuoni nella zona del metossile, mentre possono esistere condizioni di condensazione che lo potrebbero shiftare a campi più alti (Ralph *et al.*, 2004). Inoltre nella struttura ligninica probabilmente prevalgono le unità guaiaciliche piuttosto che le paraidrossifeniliche poiché il segnale a 153 ppm di queste ultime risulta poco intenso rispetto a quelli dei carboni fenolici del guaiacile a circa 145 ppm (Figura 3.2.5). Tuttavia la presenza prevalente del segnale a 108 ppm, attribuibile a C2 e C6 in strutture tipo siringile, piuttosto che a 115 ppm attribuibile al guaiacile, si può spiegare se nella struttura polimerica della lignina sono prevalenti le condensazioni fra gli ossigeni dei C4 di un monomero del guaiacile o del paraidrossifenile e i C5 di un guaiacile (Figura 3.2.5), che renderebbero quest'ultima unità, all'interno della struttura macromolecolare, con risonanze simili a quelle del siringile per i carboni C2 e C6 senza incrementare il segnale dell'aril-O. Inoltre la forte intensità del segnale a circa 60 ppm, con un'area quasi paragonabile a quella dei restanti Csp³-O in cui risuonano fondamentalmente i C α -O e C β -O, lascia ritenere che nella lignina della vite il C γ non partecipi alla condensazione delle unità monomeriche della lignina, ovvero sono scarsamente presenti unità strutturali come il pinosresinolo (Fig. 3.2.5) in cui il C γ risuonerebbe a 72 ppm (Abe e Yamauchi, 1988).

La lignina del legno con strie nere rimane essenzialmente con le stesse caratteristiche dell'aromaticità di quella del legno asintomatico, infatti le due lignine mostrano un rapporto aril-O/arile totale pressoché coincidente. Ridotto invece è il contenuto di metossile suggerendo un processo di demetilazione nel legno con strie nere. In tale lignina risulta anche ridotto il contenuto di alchile.

Nella lignina del legno bruno-rosso si può ritenere che non ci sia stata una evidente demolizione dell'aromaticità come quella procurata dall'attività di funghi, in particolare i white rot, che lascia residui di chetoacidi alchilici prodotti nella via ossidativa del 3-ossoadipato (Kirk *et al.*, 1980). Infatti non risultano evidenti i segnali chetonici intorno a 200 ppm, e rispetto allo spettro della lignina del legno asintomatico si osserva un aumento di arile totale e una diminuzione di alchile totale, sebbene si registri un leggero incremento dell'acidità carbossilica. Nella zona dell'aromatico della lignina del legno bruno-rosso appare molto evidente un incremento del segnale a circa 115 ppm, che può essere indicativo di un apporto ulteriore di polifenoli condensati che contribuirebbero a determinare anche il considerevole aumento del segnale dell'aril-O, soprattutto per rigonfiamento verso campi più bassi (Fig. 3.2.4), da cui deriva anche l'incremento del rapporto aril-O/arile totale nonostante

l'aumento anche degli arili totali. Infatti questo aumento del segnale a 115 ppm non è ragionevolmente attribuibile né a una eventuale prevalente degradazione delle unità paraidrossifeniliche contenenti meno carboni risonanti a 115 ppm rispetto ai gruppi guaiacilici (Fig. 3.2.5), né a eventuali addizioni di gruppi OH (Kirk *et al.*, 1980) sui gruppi paraidrossifenilici, che trasformandoli in specie catecoliche incrementerebbero la presenza di segnali a 115 ppm, in quanto il segnale a 153 ppm tipico dell'aromatico paraidrossisostituito non risulta attenuato. Inoltre, addizioni di gruppi OH sulle unità guaiaciliche incrementerebbero il segnale a 153 ppm ma diminuirebbero i carboni risonanti a 115 ppm, e processi di demolizione delle catene laterali o di demetilazione (Kirk *et al.*, 1980) non altererebbero granché gli shift dei carboni aromatici. Questo apporto di ulteriori fenoli può essere ascritto alla deposizione di polifenoli stilbenici condensati, poiché le variazioni nello spettro della lignina del legno bruno-rosso coincidono con i prevalenti segnali riscontrati nei prodotti della reazione di Fenton sull'estratto metanolico, costituiti in parte da polifenoli condensati ad alto peso molecolare (paragrafo 3.1). Infatti lo spettro NMR ^{13}C CP-MAS dei prodotti di reazione (Figura 3.2.6b) presenta evidenti segnali nella zona dell'aromatico a 157 ppm, dei carboni arilici ossigenati, e a 115 ppm, delle unità paraidrossifeniliche, entrambi attribuibili alle fitoalessine stilbeniche contenute nell'estratto metanolico. Il segnale a 115 ppm non risulta granché alterato dalla reazione ossidativa radicalica (Fig. 3.2.6a) che comporta invece l'abbattimento soprattutto dei segnali a 102, 97, 76 e 71 ppm, probabilmente dovuto all'ossidazione dei residui glicosidici legati ai polifenoli, confermando quanto si è osservato dalle indagini FT-IR (paragrafo 3.1). Dopo la reazione di Fenton, al segnale a circa 71 ppm potrebbero contribuire i carboni del gruppo vinilico delle strutture stilbeniche e di lignani, idrossilati o eterificati per condensazione con gruppi fenolici dei polifenoli della miscela. Il segnale a 56 ppm può essere dovuto ai metossili di lignani, ma prevalentemente, a carboni sp^3 non ossigenati, come quelli presenti nelle viniferine, e anche a carboni vinilici C-C condensati. Il decremento dell'intensità del picco a 106 ppm, tipico dei gruppi 3,5-diidrossisostituiti delle viniferine, dopo reazione di Fenton suggerisce che essi siano stati oggetto di maggiore sostituzione nella condensazione. Inoltre è da ritenere più diffusa la formazione di legami di condensazione C-C piuttosto che C-O-C nel prodotto di condensazione della Fenton, poiché non si osserva la tendenza ad un aumento del segnale dei carboni aromatici ossigenati a 157 ppm rispetto alla miscela dell'estratto metanolico non reagita.

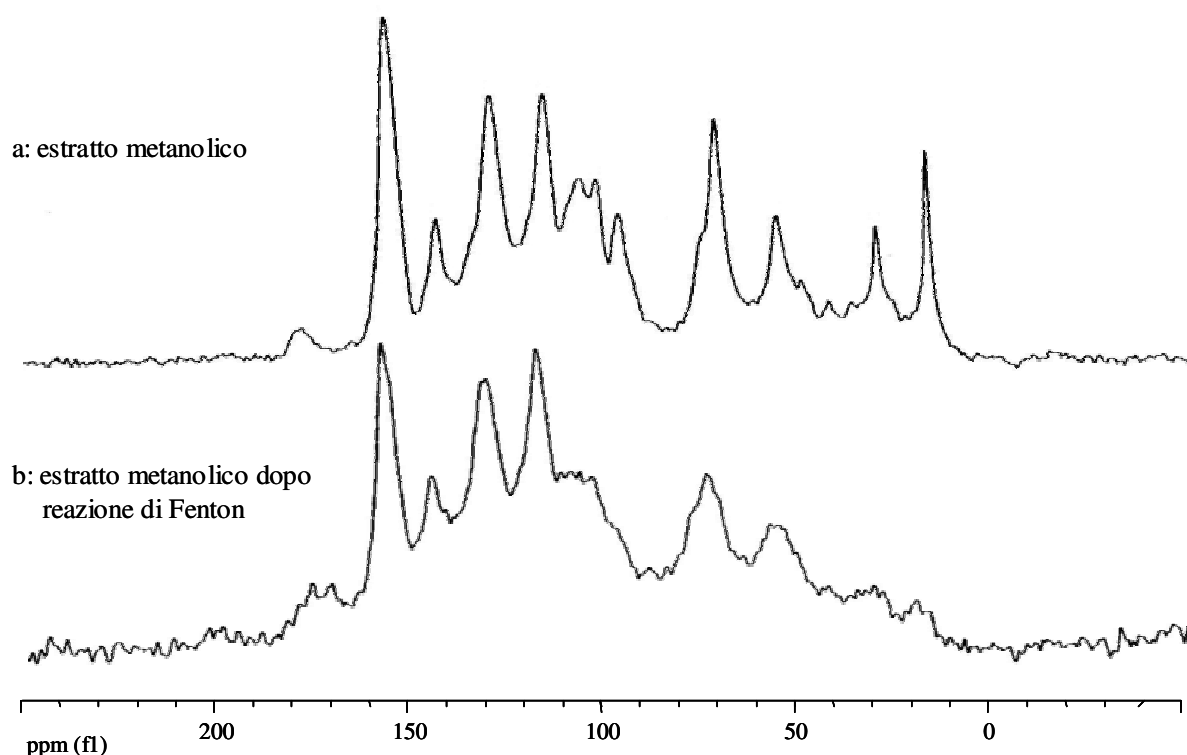


Figura 3.2.6. Spettri ^{13}C NMR CP-MAS dell'estratto metanolico di legno sintomatico tal quale (a) e dopo reazione di Fenton (b).

Nella lignina del legno bruno-rosso, rispetto alla lignina del legno asintomatico, la riduzione del segnale di $\text{C}\gamma$ senza una proporzionale diminuzione di quello di $\text{C}\alpha\text{-O}$ e $\text{C}\beta\text{-O}$, potrebbe dipendere dal contributo, nella zona delle risonanze di questi ultimi due carboni, dato dai polifenoli condensati, per cui tale diminuzione del $\text{C}\gamma$ non può essere ritenuta indicativa delle tipiche demolizioni delle catene laterali operate da funghi (Kirk *et al.*, 1980). D'altra parte queste demolizioni prevederebbero il residuo di un $\text{C}\alpha$ carbossilico, ma il segnale di questo gruppo funzionale non risulta, come già detto, vistosamente incrementato. Supponendo che il $\text{C}\gamma$ sia rimasto nello stesso rapporto con il $\text{C}\beta\text{-C}$ della lignina inalterata del legno asintomatico, e che sia trascurabile l'apporto di ulteriori specie risonanti in quella zona dovuto al contributo dei polifenoli condensati, il computo del metossile risulta dare un valore ridotto rispetto a quello della lignina del legno asintomatico, suggerendo che la lignina del legno bruno-rosso ha subito una demetilazione.

Discussione

Le determinazioni chimiche e le osservazioni spettroscopiche NMR ^{13}C CP-MAS e FT-IR dei legni hanno evidenziato per il legno bruno-rosso demolizione fondamentale di emicellulose e cellulosa non cristallina, e alterazione delle pectine, mentre la lignina non risulta granché alterata. A tale deterioramento si è probabilmente sovrapposto l'effetto della deposizione di polifenoli di risposta. Tali aspetti sono meno rilevanti nel legno con strie nere. In quest'ultimo legno appare piuttosto un incremento di sostanze pectiche e fenoliche, probabilmente da attribuire alla deposizione da parte della pianta di queste sostanze nei vasi xilematici. Questa potrebbe essere stata causata dalla risposta della pianta a fenomeni di embolia (Salisbury e Ross, 1994) che potrebbero essersi propagati lungo una colonna di vasi all'avanzare in essi delle ife dei funghi tracheomicotici Pch e Pal a partire dalla zona d'infezione in cui ne alterano la tenuta. In questi vasi la presenza di pectine potrebbe addirittura favorire l'espansione dei funghi pectinolitici Pch e Pal, nonostante la deposizione di fenoli, visto che questi ultimi non sembrano avere una forte attività antifungina (Amalfitano *et al.*, 2005).

Il deterioramento delle emicellulose nei tessuti del legno bruno-rosso è in accordo con la capacità degradativa di Pch e Pal rilevata in esperimenti in vitro (Mugnai *et al.*, 1997a; Mugnai *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2006). L'alterazione prevalente della cellulosa non cristallina piuttosto che quella cristallina, è anch'essa in accordo con l'evidenza di attività enzimatiche di Pch e Pal di endoglucanasi ma non di esoglucanasi (Eriksson, 1981; Kirk e Cowling, 1984; Mugnai *et al.*, 1999). La lignina è risultata poco alterata nell'aromaticità suggerendo quindi una scarsa attività ligninolitica di questi funghi, sebbene sia stata riscontrata una occasionale presenza di attività fenolossidasiche e perossidasiche (Mugnai *et al.*, 1997a; Mugnai *et al.*, 1999, Santos *et al.*, 2006) e la capacità di crescere su substrati fenolici (Mugnai *et al.*, 1997b; Bruno e Sparapano, 2006). Tuttavia nel legno bruno rosso si può ritenere che ci siano state forti reazioni di ossidazione radicalica viste: la demetilazione della lignina (Hammel *et al.*, 2002), la formazione di specie polifenoliche condensate che accompagnano la lignina, nonché la presenza di specie fenoliche condensate con carboidrati nella frazione pectica, probabilmente quest'ultima degradata in parte nella sua componente polisaccaridica per l'attività pectinolitica di Pch e Pal (Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006). D'altra parte una degradazione di questo genere è già concepita per funghi brown rot, cui si attribuisce la capacità di attivare processi di disfacimento promuovendo reazioni tipo

Fenton che possono intervenire anche nella degradazione dei polisaccaridi (Kerem, *et al.*, 1998; Hammel *et al.*, 2002).

L'osservazione che questi funghi sono capaci di accrescersi anche in substrati fenolici (Mugnai *et al.*, 1997b; Bruno e Sparapano, 2006), ma che nel legno non hanno operato demolizione degli anelli aromatici della lignina, può dipendere dalla disponibilità di carboidrati come è stato osservato anche in prove in vitro con funghi come i brown rot in cui viene repressa la decomposizione di polimeri ligninici con l'aumento di carboidrati disponibili (Kirk *et al.*, 1980). Tuttavia una condensazione dei fenoli di risposta sulla lignina formando eteri aromatici può ostacolare la formazione di specie catecoliche, derivanti dalla demetilazione delle unità guaiaciliche o dall'idrossilazione dei paraidrossifenili, la cui formazione è una premessa per la demolizione dell'aromaticità ligninica (Kirk *et al.*, 1980; Deacon, 2000). Ciò può aver protetto la lignina dall'attacco dei funghi dell'esca.

All'ipotesi che questi funghi siano capaci di attivare reazioni di formazione di specie radicaliche ossigenate, per sviluppo di H_2O_2 e molecole complessanti che catturano specie come il ferro per renderlo disponibile alla formazione di ROI, si sovrappone l'evidente capacità di una intensa risposta ossidativa della pianta, testimoniata dall'alta deposizione di fitoalessine (paragrafo 3.1), tipica della reazione di ipersensibilità (Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002).

3.3 CONCIMAZIONI FOGLIARI

Mortalità nei vigneti

La mortalità, valutata nei vigneti in oggetto ogni anno per 12 anni consecutivi dal 1994 al 2005, si è evidenziata solo dal 1999 a Controguerra e dal 1997 a Giulianova, con un trend crescente negli anni successivi (Figure 3.3.1 e 3.3.2).

Nel vigneto di Controguerra è stato possibile osservare percentuali annuali di viti morte variabili da un minimo dello 0,54% a un massimo del 2,7% nell'intervallo 1999 – 2005, mentre a Giulianova tali valori mostravano variazioni dallo 0,61% nel 1997 al 6,77% nel 2003; inoltre nel vigneto di Giulianova la mortalità annuale non ha subito aumenti negli ultimi due anni dopo il massimo del 2003.

La mortalità cumulata (sommatoria delle viti morte in ciascun anno) ha seguito un andamento esponenziale attestandosi nel 2005, ultimo anno di monitoraggio, sul valore del 10% a Controguerra e del 27,17% a Giulianova.

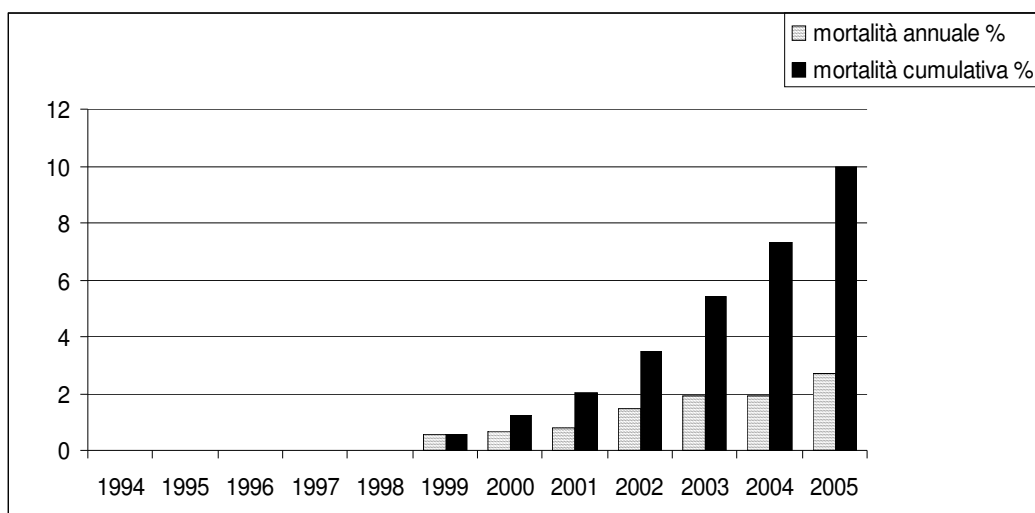


Figura 3.3.1. Mortalità annuale e cumulativa di viti affette da “esca proper” nel vigneto di Controguerra.

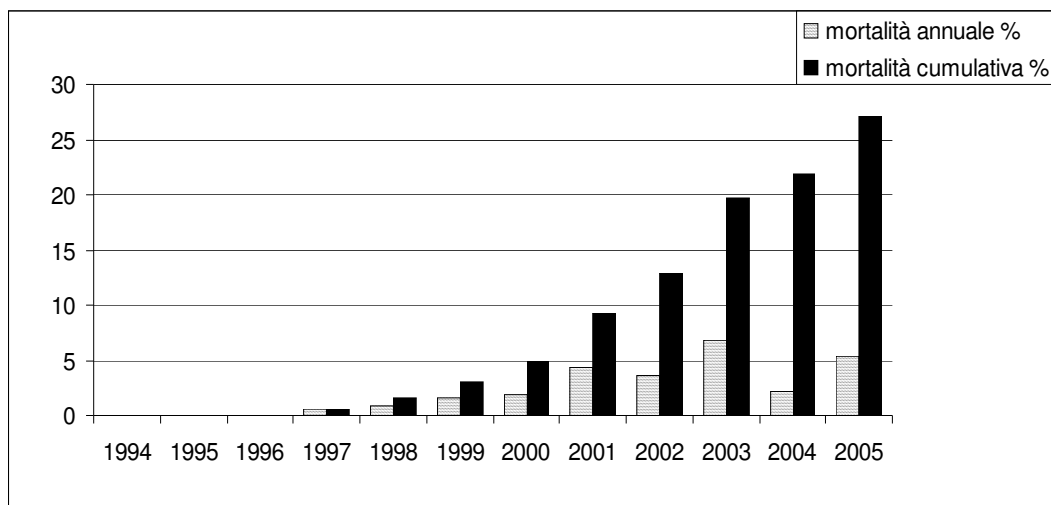


Figura 3.3.2. Mortalità annuale e cumulativa di viti affette da “esca proper” nel vigneto di Giulianova.

Sintomi fogliari

L’incidenza e l’intensità di espressione dei sintomi fogliari sono risultate significativamente superiori nelle parcelle trattate con bioattivatori e nutrienti rispetto alle parcelle non trattate, tranne che per il vigneto di Controguerra nel 2005 (Figura 3.3.3; Tabella 3.3.1).

Nel vigneto di Controguerra le viti trattate hanno mostrato complessivamente un valore di incidenza di espressione dei sintomi fogliari elevato, nell’anno 2004, e pari al 42,67%, contrariamente a quanto rilevato nella parcella di controllo dove il valore di incidenza percentuale era risultato 25,13%; nel 2005 tali valori sono risultati pressoché simili nelle viti trattate e non trattate, con una incidenza dei sintomi pari al 36,17% ed al 36,7% rispettivamente. Nel medesimo vigneto, la gravità di espressione in percento è risultata superiore, in entrambi gli anni di studio, nella parcella trattata con valori pari al 24,86% ed al 19,29% rispetto al 12,39% ed al 15,42% nella parcella di controllo, rispettivamente nel 2004 e nel 2005.

Nel vigneto di Giulianova i trattamenti fogliari hanno sortito un effetto analogo a quello osservato nel vigneto di Controguerra; l’incidenza dei sintomi fogliari è risultata superiore nella parcella trattata, sia nel 2004 che nel 2005, con valori attestati rispettivamente

sul 6,95% e sul 15,63% contro il 4,65% e l'11,91% della parcella non trattata; allo stesso modo anche la gravità di espressione percentuale è risultata più elevata nella parcella trattata nelle due stagioni, pari al 18,68% nel trattato ed al 10,23% nel controllo nel 2004; 27,98% nel trattato e 20,36% nel controllo nel 2005.

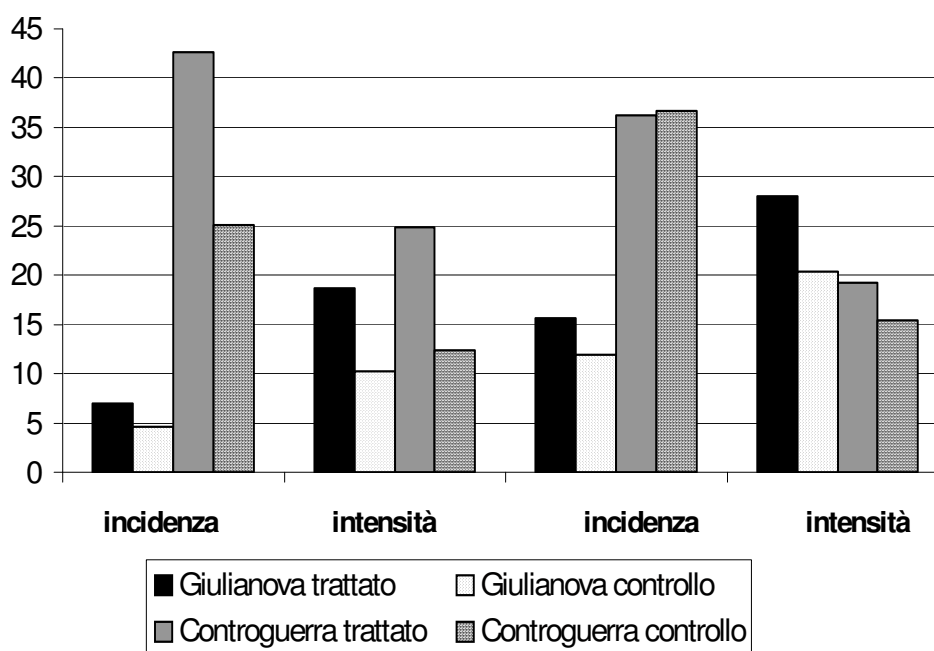


Figura 3.3.3. Incidenza ed intensità dei sintomi fogliari su viti affette da esca trattate con nutrienti e bioattivatori e viti non trattate.

Tabella 3.3.1. Significatività statistica del confronto dell'incidenza ed intensità dei sintomi fogliari tra viti trattate con nutrienti e bioattivatori e viti non trattate. I valori sono espressi come χ^2 ; $\chi^2 > 0,05$ non esprime significative differenze.

	2004		2005	
	incidenza %	intensità %	incidenza %	intensità %
Controguerra	0,0003	0,0001	0,9972	0,1541
Giulianova	0,0137	0,0288	0,0036	0,0434

Analisi chimiche della produzione

Le determinazioni analitiche effettuate sulla frazione vinificabile delle uve di viti sintomatiche prelevate a maturità di raccolta nelle parcelle trattate con nutrienti e bioattivatori, e nelle parcelle non trattate del vigneto di Controguerra, negli anni 2004 e 2005, hanno mostrato una sostanziale similitudine nei principali parametri legati alle caratteristiche qualitative del mosto; infatti i livelli di zuccheri riducenti, di pH, di acidità totale e delle frazioni acide considerate non hanno evidenziato significative differenze statistiche (Tabella 3.3.2). Le viti sane contrariamente alle malate trattate e non trattate hanno mostrato livelli di zuccheri conformi allo standard della cultivar nel 2005. Inoltre le viti sane in tutte e due le annate hanno mostrato minori livelli rispetto alle piante malate di acidità totale e di acido tartarico, per il malico solo nel 2005 quando le uve di piante malate non raggiungevano un grado di maturazione adeguato.

I livelli dei macroelementi e dei microelementi della frazione vinificabile delle uve di viti sintomatiche, hanno mostrato differenze tra viti trattate e non trattate relativamente ai contenuti di azoto, ferro, manganese e rame il cui contenuto è apparso inferiore nelle uve delle viti trattate (Tabella 3.3.3); i decrementi del contenuto di questi nutrienti risultavano pari a 1,24 e 2,04 g Kg⁻¹ per l'azoto, a 3,35 e 4,58 per il ferro, 1,1 e 1,55 per il manganese, e 1,48 e 4,08 mg Kg⁻¹ per il rame, nel 2004 e nel 2005 rispettivamente. Nel 2004 tali differenze sono risultate solo tendenziali per azoto e rame, significative per il manganese e per il ferro mentre nel 2005 sono risultate statisticamente significative per tutti gli elementi citati. Negli acini delle viti sane i livelli dei medesimi elementi sono risultati quasi sempre inferiori rispetto a quelli delle viti malate e tali differenze hanno nella maggior parte dei casi significatività statistica; in particolare il contenuto di ferro e rame è apparso sensibilmente inferiore a quello riscontrato nelle viti malate nell'anno 2005 (Tabella 3.3.3).

Tabella 3.3.2. Analisi chimiche condotte per il vigneto di Controguerra sul mosto ottenuto da bacche senza sintomi di viti sintomatiche trattate e non trattate, affette da esca proper, e da bacche di viti sane.

Gruppi di viti ^a	zuccheri riducenti g l ⁻¹		pH		acidità totale g l ⁻¹		acido tartarico g l ⁻¹		acido malico g l ⁻¹	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Malate trattate	177.4 a ^b	149.4 b	3,48 a	3,20 a	6,53 a	8,80 a	3,65 a	5,20 a	3,47 a	4,52 a
Malate non trattate	180.0 a	142.5 b	3,35 a	3,13 a	6,53 a	9,17 a	3,75 a	5,24 a	3,25 a	5,25 a
Sane	187.0 a	190.0 a	3,61 a	3,41 a	4,92 b	4,29 b	2,20 b	3,27 b	3,74 a	2,62 b

^a L'analisi statistica compara separatamente mosti da ogni gruppo di viti in ogni anno

^b Differenti lettere in colonna significano differenza significativa in accordo con il test di Duncan (P=0.05)

Tabella 3.3.3. Analisi chimiche condotte per il vigneto di Controguerra su bacche senza sintomi di viti sintomatiche trattate e non trattate, affette da esca proper, e su quelle di viti sane.

Gruppi di viti ^a	N g Kg ⁻¹		P g Kg ⁻¹		K g Kg ⁻¹		Ca g Kg ⁻¹		Mg g Kg ⁻¹		Fe mg Kg ⁻¹		Mn mg Kg ⁻¹		Cu mg Kg ⁻¹		Zn mg Kg ⁻¹	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Malte trattate	6,03 a ^b	8,33 b	1,41 a	1,40 a	12,67 a	13,03 b	1,83 a	2,40 a	0,53 a	0,55 a	10,67 b	16,74 b	3,67 b	3,73 b	14,36 a	13,54 b	6,46 a	7,71 a
Malate non trattate	7,27 a	10,37 a	1,43 a	1,44 a	12,19 a	13,49 b	1,63 a	2,71 a	0,53 a	0,63 a	14,02 a	21,32 a	4,77 a	5,28 a	15,84 a	17,62 a	6,25 a	6,89 a
Sane	4,74 b	6,16 c	1,28 a	1,20 a	11,89 a	15,57 a	1,32 a	1,17 b	0,61 a	0,65 a	13,56 a	11,88 c	3,99 b	5,57 a	10,91 b	7,81 c	4,65 b	4,78 b

^a L'analisi statistica compara separatamente mosti da ogni gruppo di viti in ogni anno

^b Differenti lettere in colonna significano differenza significativa in accordo con il test di Duncan (P=0.05)

Discussione

I rilievi nei due vigneti, entrambi di 32 anni di età nel 2005, effettuati dal 1994 al 2005, hanno evidenziato valori di mortalità delle piante oscillanti tra 0,5% e 6,7%, quest'ultimo, valore massimo assoluto registrato nel vigneto di Giulianova nel 2003. Poiché si può supporre che la malattia sia iniziata ben prima del 1994 (Larignon and Dubos, 2000), si conferma la capacità delle piante di vite di convivere a lungo con la malattia. In questo contesto, peraltro generalizzabile, appare consigliabile l'approntamento di interventi atti a ridurre incidenza ed intensità dei sintomi fogliari, anche perché le viti malate ma asintomatiche vegetano e producono come quelle sane (Calzarano *et al.*, 2001; 2004).

I trattamenti con bioattivatori e nutrienti hanno determinato, nella maggior parte dei casi, una maggiore e significativa incidenza ed intensità di sintomi fogliari. Tale risultato potrebbe essere correlato alla capacità di tali prodotti di stimolare i processi fisiologici delle piante, come fotosintesi, respirazione, conduttanza stomatica, con conseguente maggiore veicolazione ed accumulo nelle foglie di tossine (Abou-Mansour *et al.*, 2004), ipotizzate come responsabili delle manifestazioni fogliari (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000), e prodotte nel legno infetto.

La somministrazione dei concimi fogliari potrebbe aver determinato nelle piante trattate un regime di sovrannutrizione. Infatti la valutazione dello stato nutrizionale delle piante, effettuata tramite diagnostica fogliare, nelle viti di entrambi i vigneti indagati, e nei medesimi anni interessati dallo studio in oggetto, non ha evidenziato sostanzialmente alcuna carenza (Fregoni, 1998) nelle piante dei due vigneti, sia sane che affette da esca, sintomatiche o asintomatiche (Calzarano, dati non pubblicati). L'ulteriore apporto di concimi fogliari potrebbe aver determinato in tali piante un accumulo di nutrienti al limite della tossicità e/o l'alterazione delle condizioni di equilibrio tra le concentrazioni dei differenti elementi nonché migliorato la condizione nutrizionale dei patogeni. E' noto come le sovrabbondanti nutrizioni delle colture possano abbassarne la capacità di resistenza agli stress (Marschner, 1995) e questo può essere evidente soprattutto con le concimazioni azotate (Huber and Watson, 1974). Potrebbe essere possibile che l'eccesso nutrizionale provocato dalle concimazioni fogliari abbia interferito con i meccanismi, tuttora sconosciuti, che rendono le viti affette da esca in grado di attenuare o mascherare l'espressione dei sintomi fogliari, meccanismi che potrebbero essere correlati con la capacità di espressione della risposta agli stress e la virulenza dei patogeni.

Il maggior contenuto di azoto riscontrato negli acini vinificabili di piante malate sintomatiche del vigneto di Controguerra rispetto a quello determinato nelle piante sane, potrebbe essere collegato a reazioni di difesa in atto nelle piante colpite. Infatti, l'accumulo di proteine di risposta come anche di prolina, segnalato nel caso di stress osmotici, sembrerebbe entrare in gioco anche nelle risposte a stress più generici per il controllo della risposta ossidativa (Xioung and Zhu, 2002). Tuttavia negli acini delle viti sintomatiche trattate è stata riscontrata una minore presenza di azoto rispetto alle malate non trattate. Tale evidenza sembra segnalare come i superiori contenuti dell'elemento nelle bacche delle viti malate, rispetto a quelli riscontrati sulle viti sane, non possano essere messi in relazione con la maggiore presenza di clorosi fogliari e con gli ulteriori apporti forniti con i trattamenti. Infatti in tale caso sarebbe stato plausibile verificare livelli più alti di azoto nelle bacche delle viti malate trattate per via della traslocazione dell'elemento dalle clorosi delle foglie tigrate, superiori nelle viti trattate, e della quota somministrata con le aspersioni fogliari. Questi risultati potrebbero suggerire l'ipotesi che l'accumulo di azoto negli acini delle piante malate sia da mettere in relazione con un meccanismo di accumulo fisiologico, nell'ambito della risposta di difesa della pianta, che risulterebbe invece meno efficiente nelle viti sottoposte a sovra nutrizione e/o a squilibri nutrizionali a causa dei trattamenti.

Oltre all'azoto, negli acini delle viti sintomatiche trattate rispetto alle malate non trattate anche i livelli inferiori di microelementi, quali Fe, Cu e Mn, tipici cofattori di enzimi di risposta per la regolazione dello stress ossidativo e nella sintesi di fitoalessine fenoliche (Marschner, 1995), sembrerebbero segnalare una minore capacità di reazione di tali piante in accordo con l'ipotizzata condizione di una ridotta capacità di risposta.

I superiori livelli di microelementi verificati negli acini delle viti malate, sia trattate che non trattate, nella stagione 2005 rispetto alla precedente, potrebbero essere dipesi dalla mancata maturazione delle uve di tali piante probabilmente imputabile ad un decorso più asciutto di questa stagione nei mesi da maggio a luglio; è noto infatti, che i microelementi nelle uve dopo un picco di concentrazione all'invasatura si riducono a maturazione raggiunta (Fregoni, 1998).

Oltre agli accumuli dei microelementi per attivazione di meccanismi di difesa non è da escludere una loro traslocazione verso gli acini. In alcune specie legnose forestali il legno infetto da funghi patogeni conteneva, in relazione all'attivazione di processi di difesa, livelli di elementi minerali, più elevati rispetto al legno sano (Shigo and Sharon, 1970); risulta plausibile quindi che ciò avvenga anche nelle viti colpite da esca dove i funghi responsabili,

tramite produzione di Low Molecular Weight Chelators (LMWC) sono in grado di chelare metalli come il ferro, ridurlo da ferrico a ferroso ai fini di compiere l'aggressione del substrato, mentre una frazione di tale ferro ridotto potrebbe essere in grado di traslocare verso l'apparato aereo (Di Marco *et al.*, 2001; Goodell *et al.*, 1997).

I decrementi di microelementi nelle uve delle viti malate trattate rispetto alle malate non trattate, ipotizzati come il segnale di una più debole risposta di tali viti alla malattia, indotta dai trattamenti, sono risultati più evidenti nel 2005 rispetto al 2004; contemporaneamente non si è determinato in tale anno un significativo aumento dei sintomi fogliari nella parcella trattata, e solo un tendenziale incremento dell'intensità di espressione. Questo suggerisce che la capacità di risposta delle viti malate non costituisca l'unico fattore coinvolto nell'espressione dei sintomi fogliari. La disponibilità di acqua e nutrienti in particolari fasi fenologiche della pianta potrebbero giocare un ruolo chiave nell'amplificare o ridurre lo stress biotico dato dalla presenza della malattia; se lo stress risulta elevato per la concomitanza di diversi fattori, la risposta di difesa della pianta malata potrebbe rivelarsi insufficiente per innescare meccanismi di contenimento dei sintomi fogliari.

Inoltre andrebbero indagate le capacità di accumulo e traslocazione degli zuccheri in relazione alla disponibilità di acqua e nutrienti, in quanto nell'annata 2005 rispetto alla precedente si è avuta una minore incidenza ed intensità dei sintomi nelle pinte malate in concomitanza ad un ritardo nella maturazione.

4. CONCLUSIONI

Lo studio dei tessuti del legno bruno-rosso e sulla sua componente polifenolica estraibile in metanolo, nonché la reattività nei confronti dei ROI di quest'ultima, ha suggerito che l'alterazione di tale legno, consistente principalmente nel decadimento delle emicellulose, pectine e cellulosa non cristallina, può essere ascritta non solo all'attività degradativa enzimatica di Pch e Pal, coerentemente con quelle espresse da prove *in vitro* (Mugnai *et al.*, 1997a, Mugnai *et al.*, 1999), ma probabilmente anche ricondotta ad una preventiva e/o parallela degradazione di questi substrati da parte dei ROI, i cui accumuli, da ritenersi principalmente originati dalla risposta ossidativa della pianta, sono stati evidenziati dalla notevole presenza di polifenoli di risposta tipici della vite e loro prodotti di condensazione radicalica nel legno bruno-rosso. Tra quelle identificate oltre al resveratrolo sono state accumulate nel legno bruno-rosso numerose viniferine, alcune di esse sembrano poter derivare da condensazione dei radicali originati dalla reazione dei polifenoli più semplici coi ROI, come si è visto *in vitro* sottoponendo resveratrolo ed ϵ -viniferina a reazione di Fenton. In tali reazioni sono stati prodotti proprio alcune delle viniferine accumulate in quantità relativamente maggiore rispetto ai loro contenuti nel legno asintomatico. Le caratteristiche della lignina del legno bruno-rosso appaiono con alterazioni superficiali tipiche di processi ascrivibili ad attacchi radicalici, come ad esempio la demetilazione. Tuttavia essa risente del contributo di specie polifenoliche di altra natura che deriverebbero dalla condensazione dei polifenoli di risposta in seguito all'esplosione ossidativa, come si è visto dall'analogia delle caratteristiche spettroscopiche del residuo ligninico del legno bruno-rosso con i prodotti di condensazione delle reazione di Fenton sulla miscela contenente i polifenoli di risposta estratti dal legno malato. Alla notevole risposta ossidativa dell'ospite è correlabile la presenza nel legno bruno-rosso di frazioni pectiche costituite da carboidrati condensati con polifenoli. Le determinazioni fatte sul legno con strie nere hanno messo in evidenza una scarsa alterazione dei tessuti ed essenzialmente accumuli di sostanze pectiche e fenoliche ascrivibili al processo di occlusione dei vasi. In definitiva le caratteristiche del legno bruno-rosso sembrano essere condizionate dalla reazione di ipersensibilità dell'ospite per arginare l'espansione dei funghi, che crea un tessuto fortemente impregnato di polifenoli, da cui deriverebbe il colore bruno, che potrebbero proteggere i carboidrati residui. Inoltre gli stessi polifenoli di risposta sembrerebbero svolgere un ruolo nel mantenere attiva la reazione di Fenton consentendo il riciclo del Fe^{2+} .

Per quanto riguarda le concimazioni fogliari, esse non hanno migliorato qualitativamente le uve vinificabili delle viti malate sintomatiche vista la sostanziale similitudine tra viti malate trattate e non trattate dei parametri che determinano la qualità delle uve, in particolare il contenuto di zuccheri e di acidi organici. L'effettuazione dei trattamenti con bioattivatori e nutrienti sembrerebbe addirittura determinare effetti negativi sulla manifestazione dei sintomi nelle viti colpite da esca. Tuttavia non è ancora da escludere la possibilità che una somministrazione più mirata di taluni elementi possa contribuire alla riduzione dell'espressione dei sintomi fogliari.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abe F. e T. Yamauchi, 1988. 9 α -hydroxypinoresinol, 9 α -hydroxymedioresinol and related lignans from *Allamanda Neriifolia*. *Phytochemistry*, **27** (2), 575-577.
- Abou-Mansour E., E. Couché, R. Tabacchi, 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms ? *Phytopathologia Mediterranea* 43, 75-82.
- Amalfitano C., A. Evidente, G. Surico, S. Tegli, E. Bertelli, L. Mugnai, 2000. Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines. *Phytopatologia Mediterranea*, **39**, 1, 178-183.
- Amalfitano C., A. Arrigo, A. Evidente, L. Mugnai, G. Surico, M. Pasi, 2003. Production of stress metabolites by grapevine tissue cultures inoculated with *Phaeomoniella chlamydospora*. 23th international symposium on the chemistry of natural products. Firenze, 28 luglio-2 agosto 2002, pp. 136.
- Amalfitano C., F. Peduto, L. Mugnai, A. Evidente, G. Surico, 2005. Chemical characterisation of stilbenic polyphenols from esca diseased wood and their role in defence mechanisms. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, University of Stellenbosh, South Africa, 20-21 January 2005.
- Arora A., R.K. Sairam, G.C. Srivastava, 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238.
- Atalla R.H. e D.L. VanderHart, 1999. The role of solid state ¹³C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solis State Nuclear Magnetic Resonance*, **15**, 1-19.
- Atkins P.W., 1985. Chimiva Fisica. *Zanichelli Editore*.
- Babbs C.F. e D.W. Griffin, 1989. Scatchard analysis of methane sulfinic acid production from dimethyl sulfoxide: a method to quantify hydroxyl radical formation in physiologic system. *Free Radical Biology & Medicine*, **6**, 493-503.
- Bala A. E. A., A. Kollmann, P.H. Ducrot, A. Majira, L. Kerhoas, P. Leroux, R. Delorme and J. Einhorn, 2000. Cis- ϵ -viniferin: a new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. *J. phytopathology*, **18**, 29-32.
- Baldwin I. T., 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 8113-8118.
- Bellamy L.J., 1975. The Infrared Spectra of Complex Molecules. London New York, Chapman and Hall.

- Bergendahl J., S. Hubbard, D. Grasso, 2003. Pilot-scale Fenton's oxidation of organic contaminants in groundwater using autochthonous iron. *Journal of Hazardous Materials*, **B99**, 43-56.
- Bezhuashvili M.G., L.A. Mudzhiri, G.F. Zakis, 2003. Structural units of the grapevine lignin. *Koksnes Kimija*, **4**, 61-63.
- Blanchette R.A., 2000. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **46**, 189-204.
- Blanchette R.A., B.W. Held, J.A. Jurgens, D.L. McNew, T.C. Harrington, S.M. Duncan, R.L. Farrell, 2004. Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. *Applied Environmental Microbiology*, **70** (3), 1328-1335.
- Bonin J., I. Janic, D. Janic, D.M. Bartels, 2007. Reaction of the hydroxyl radical with phenol in water up to supercritical conditions. *J. Phys. Chem. A*, **111** (10), 1869-1878.
- Borie B., P. Jeandet, A. Parize, R. Bessis, M. Adrian, 2004. Resveratrol and Stilbene Synthase mRNA Production in Grapevine Leaves Treated with Biotic and Abiotic Phytoalexin Elicitors. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55** (1), 60-64.
- Browning B.L., 1967. Method of wood chemistry. Interscience publishers.
- Bruno G e L. Sparapano, 2006. Effect of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69** (4-6), 182-194.
- Buettner G.R., T.P. Doherty, L.K. Patterson, 1983. The kinetics of the reaction of superoxide radical with Fe(III) complexes of EDTA, DETAPAC and HEDTA. *FEBS*, **158**, 143-146.
- Butler M.J. e A.W. Day, 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 1115-1136.
- Buxton G.V., C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross, 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2^-$) in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical*, **17** (2), 513-886.
- Calderon A.A., J.M. Zapata, R. Munoz, M.A. Pedreno, A.R. Barcelo, 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytol.*, **124**, 455-463.
- Calzarano F. e S. Di Marco, 1997. Il "mal dell'esca" della vite: stato della ricerca. *Informatore Fitopatologico*, **47** (9), 9-20.

- Calzarano F., A. Cichelli, M. Odoardi, 2001. Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano D'Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, Supplemento, S443-S448.
- Calzarano F., L. Seghetti, M. Del Carlo, A. Cichelli, 2004. Effect of esca on the quality of berries, musts and wines. *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 125-135.
- Cavanni P., F. Fantuz, I. Ponti, 1987. Vite: le malattie crittogamiche del legno. *Vignevini*, **1**, 19-25.
- Cesari A., S. Di Marco, F. Calzarano, 2005. Presenza del mal dell'esca nell'area viticola della provincia di Teramo. Strategie sperimentali di difesa a basso impatto ambientale. *Monografia*, Media Edizioni, p. 59.
- Cichewicz R.H. e S.A. Kouzi, 2002. Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman (Ed), Elsevier Science B.V., **26**, 507-579.
- Cornejo J. e P. Jamet, 2000. Pesticide/Soil interaction. Edizione INRA.
- Craven A., 2000. Bound residues of organic compounds in the soil: the significance of pesticide persistence in soil and water: a European regulatory view. *Environmental pollution*, **108**, 15-18.
- Craven A. e S. Hoy, 2005. Pesticide persistence and bound residues in soil-regulatory significance. *Environmental pollution*, **133**, 5-9.
- Crous P.W., L. Swart, S. Coertze, 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S464-S466.
- Davin L.B., H.B. Wang, A.L. Crowell, D.L. Bedgar, D.M. Martin, S. Sarkanen, N.G. Lewis, 1997. Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. *Science*, **275**, 362-366.
- Dawidar A.M., J. Jakupovic, M. Abdel-Mogip, I.A. Mashaly, 1994. Prenylstilbenes and prenylflavanones from *Schoenus nigricans*. *Phytochemistry*. **36**, 803-806.
- Deacon J. L., 2000. Micologia moderna. *Edagricole*, pp 414.
- Del Rio J.A., A. Gonzales, M.D. Fuster, J.M. Botia, P. Gomez, V. Frias, A. Ortuno, 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S394-S399.

- Delaunay J., C. Castagnono, C. Chèze, J. Vercauteren, 2002. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of chromatography A*, **964**, 123-128.
- Di Marco S., A. Mazzullo, F. Calzarano, A. Cesari, 2000. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 232-240.
- Di Marco S., F. Osti, A. Mazzullo, A. Cesari, 2001. How iron could involved in esca fungi development. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S449-S452.
- Dixon R.A. e Paiva N.L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- Eriksson K.E., 1981. Fungal degradation of wood components. *Pure & Appl. Chem.*, **53**, 33-43.
- Evidente A., L. Sparavano, A. Andolfi, G. Bruno, 2000. Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopatologia Mediterranea*, **39**, 162-168.
- Feliciano A.J. e W.D. Gubler, 2001. Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp.. *Phytopatologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S387-S393.
- Fenton H. J. H., 1894. Oxidation of Tartaric Acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.*, **65**, 899-910.
- Filley T.R., G.D. Cody, B. Goodell, J. Jellison, C. Noser, A. Ostrofsky, 2002. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Organic Geochemistry*, **33**, 111-124.
- Fischer M. e H.H. Kassemeyer, 2004. *Fomitiporia mediterranea*, a new basidiomycete species associated with esca of grapevine in Europe: biology, ecology, and distribution. *Phytopathologia Mediterranea*, **43**, 144.
- Fourie P.H., F. Halleen, J. van der Vyver, W. Schreuder, 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the root and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S473-S478.
- Foyer C.H. e G. Noctor, 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling : A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Fregoni, M. 1998. Viticoltura di qualità. *Edizioni Informatore Agrario s.r.l.*, p.707

- Galet P. 1997. Les maladies et les parasites de la vigne. In : Tome 1. Les maladies dues à des végétaux. *Le Paysan du Midi, Montpellier*, 409-430.
- Gaudinon M. 1959. Rapport national: Oidium, Esca, Excoriose. *Bul. OIV*, **31**, 28-40.
- Gavrilescu M., 2005. Fate of Pesticide in the Environment and its Bioremediation. *Eng. Life Sci.*, **5** (6), 497-526.
- Geoffrion R., 1982. L'esca de la vigne. *Phytoma*, **29**, 25-26.
- Gol'man L.P. e V.M. Reznikov, 1974. Absorption of methoxy groups in the infrared spectra of lignin. Beloruss. Tekhnol. Ist. im. Kirova, Minsk, USSR. Ispol'z. Lignina, 140-148. Editore Sergeev. V.N. Khim.
- Goodell B., J. Jellison, J. Liu, G. Daniel, A. Paszczynski, F. Fekete, S. Krishnamurthy, L. Jun, G. Xu, 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology*, **53**, 133-162.
- Gorham J., 1995. *The Biochemistry of the Stilbenoids*. Chapman and Hall, New York.
- Gottstein D. e D. Gross, 1992. Phytoalexins of woody plant. *Trees*, **6**, 55-68.
- Gozzo F., 2003. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4487-4503.
- Graniti A., G. Surico, L. Mugnai, 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex disease?. *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 16-20.
- Grant J.J. e G.J. Loake, 2000. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology*, **124**, 21-29.
- Green III F., T.A. Kuster, T.L. Highley, 1996. Pectin degradation during colonization of wood by brown-rot fungi. *Recent Res. in Plant Pathology*, **1**, 83-93.
- Hammel K.E., 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New J. Chem.*, **20**, 195-198.
- Hammel K.E., A.N. Kapich, K.A. Jensen Jr., Z.C. Ryan, 2002. Reactive oxygen species as agent of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 445-453.
- Hammond-Kosack K.E. e J.D.G. Jones, 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Heil M., 2002. Ecological costs of induced resistance. *Plant Biology*, **5**, 1-6.
- Huber D.M. e R.D. Watson, 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, **12**, 139-155.

- Illman B.L., 1991. Oxidative degradation of wood by brown-rot fungi. In Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, Pell E., K. Steffen eds.
- Ishii T., 1997. Structure and function of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, **127**, 111-127.
- Ito J. e M. Niwa, 1996. Absolute structure of new hydroxystilbenoids, vitisin C and viniferal, from *Vitis vinifera* Kyohou. *Tetrahedron*, **52**, 9991-9998.
- Ito J., M. Niwa, Y. Oshima, 1997. A new hydroxystilbene tetramer named isohopephel from *Vitis vinifera* Kyohou. *Heterocycles*, **45**, 1809-1813.
- Ito J., K. Gobaru, T. Shimamura, M. Niwa, 1998. Absolute configuration of some oligostilbenes from *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* Kyohou. *Tetrahedron*, **54**, 6651-6660.
- Jacob A.K., I.B. Dry, S.P. Robinson, 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, **48**, 325-336.
- Jeandet P., R. Bessis, B. Gautheron, 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 1.
- Jeandet P., A. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, M. Adrian, 2002. Phytoalexins from the vitaceae : biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry*, **50**, 2731-2741.
- Kamada F., S. Abe, N. Hiratsuka, H. Warishi, H. Tanaka, 2002. Mineralization of aromatic compounds by brown-rot basidiomycetes – mechanisms involved in initial attack on the aromatic ring. *Microbiology*, **148**, 1939-1946.
- Kang N., D.S. Lee, J. Yoon, 2002. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. *Chemosphere*, **47**, 915-924.
- Keckeis, K., S.D. Sarker, L. Dinan, 2000. Resveratrol-type oligostilbenes from *Iris clarkei* antagonize 20-hydroxyecdysone action in the *Drosophila melanogaster* BII cell line. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**, 333-336.
- Kerem Z., W. Bao, K.E. Hammel, 1998. Rapid polyether cleavage via extracellular one-electron oxidation by a brown-rot basidiomycete. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 10373-10377.
- Khan M. A., S. G. Nabi, S. Prakash, A. Zaman, 1986. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissua pallida*. *Phytochemistry*, **25** (8) 1945-1948.

- Kim Y.S. e A.P. Sing, 2000. Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review. *IAWA Journal*, **21** (2), 1335-155.
- Kindl H., 1985. In *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*; Higuchi, T., Ed.; Academic Press: New York, 349-377.
- Kirk T.K., T. Higuchi, H. Chang, 1980. Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications. CRC press.
- Kirk. T.K. e E.B. Cowling, 1984. Biological decomposition of solid wood. In: Rowell, R.M. The Chemistry of Solid Wood. Adv. Chem. Ser. 207. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Kitakana S., T. Ikezawa, K. Yslkawa, S. Yamanouchi, M. Takido, H. Kìl Sung, H. Kim, 1990. (+)-alfa-Viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root. *Chem. Pharm. Bull.* **38** (2) 432-435.
- Klemen-Leyer K., E. Agosin, A.H. Conner, T.K. Kirk, 1992. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by White rot and brown rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (4), 1266-1270.
- Kolthoff I. M., E. B. Sandell, E.J. Meehan, S. Bruckenstein, 1974. Analisi chimica quantitativa. *Piccin editore Padova*.
- Kurihara H., J Kawabata, S. Ichikawa, J. Mizutani, 1990. (-)-ε-Viniferin and related oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb. (Cyperaceae). *Agric. Biol. Chem.*, **54** (4), 1097-1099.
- Langcake P. e R.J. Pryce 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection. *Physiological Plant Pathology*, **9**, 77-86.
- Langcake P. e R.J. Pryce, 1977. The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultra-violet irradiations. *Phytochemistry*, **16**, 1193-1196.
- Langcake P., C.A. Cornford and R.J. Pryce 1979. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, **18**, 1025-1027.
- Langcake P e W.V. McCarty 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, **18**, 244-253.
- Langcake P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ε-viniferin, α-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, **18**, 213-226.

- Larignon P. e B. Dubos, 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 184-189.
- Larignon P. e B. Dubos, 2001. Le Black Dead Arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma – La Défense des Végétaux*, **576**, 22-27.
- Leonard S. S., C. Xia, B. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G. K. Harris, X. Shi, 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**, 1017-1026.
- Levin D.A., 1973. The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology*, **48** (1), 3-15.
- Lorenz D.H., K.W. Eichhorn, H. Bleiholder, R. Close, U. Meier, E. Weber, 1995. Phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Encoding and description of the phenological stages of the grapevine according to the extended BBCH scheme. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **1** (2), 100-103.
- Lorito M., S. Woo, F. Scala, 2004. Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. *Agroindustria*, **3** (2), 180-195.
- Lundqvist M. J. e L. A. Eriksson, 2000. Hydroxyl radical reactions with phenol as a model for generation of biologically reactive tyrosyl radicals. *J. Phys. Chem*, **104**, 848-855.
- Mackova M., D.N. Dowling, T. Macek, 2006. Phytoremediation and Rhizoremediation. Edizione Springer.
- Maggio A., 2005. Tra genomica e produzione agricola: quale ruolo per l'agronomia?. *AGRIculture*, **2**, 4-6.
- Mamedov B.M., E.T. Aslanova, N.A. Alekperov, 2005. Investigation of regularities and products of oxidative polycondensation of 1,3-benzendiol. *Iranian Polymer Journal*, **14** (5), 401-410.
- Marchi G., S. Roberti, R. D'Ovidio, L. Mugnai, G. Surico, 2001. Pectic enzymes production by *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S407-S416.
- Marchi G., F. Peduto, L. Mugnai, S. Di Marco, F. Calzarano, G. Surico, 2006. Some observations on the relationship on manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea*, **45**, 117-126.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. (Second edition) *Academic press, London*. p.889.

- Mason M.G., P. Nicholls, M.T. Wilson, 2003. Rotting by radical – the role of cellobiose oxidoreductase?. *Biochemical Society Transaction*, **31** (6), 1335-1336.
- Massarini E., 1957. Ulteriori ricerche sopra derivati stilbenici e difeniletanici. *Il Farmaco*, XII, **5**, 380-386.
- Mazzullo A., S. Di Marco, F. Osti, A. Cesari, 2000. Bioassays on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **23**, 3, 357-365.
- Mert-Turk F., 2002. Phytoalexins: Defence or just a response to stress?. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **1**, 1-6.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.
- Miyazaki T., Y. Katsumura, M. Lin, Y. Muroya, H. Kudo, M. Taguchi, M. Asano, M. Yoshida, 2006. Radiolysis of phenol in aqueous solution at elevated temperatures. *Radiation Physics and Chemistry*, **75**, 408-415.
- Morrissey J.P. e A.E. Osbourn, 1999. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63**, 708-724.
- Muccinelli M., 2006. Prontuario degli agrofarmaci. Edizione Edagricole.
- Mugnai L., G. Surico, A. Sfalanga, 1997 (a). Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal “mal dell’esca”. *Micologia Italiana*, **1**, 11-22.
- Mugnai L., E. Bertelli, G. Surico, E. Bruno, 1997 (b). Effetto di alcune sostanze fenoliche sulla crescita di funghi del legno di viti colpite dal “mal dell’esca”. *Giornale di patologia delle piante*, **7**, 35-46.
- Mugnai L., A. Graniti, G. Surico, 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, **83** (5), 404-417.
- Murphy J. e J.P. Riley, 1962. Modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Analytica Chimica Acta* **27**, 31-36.
- Odjakova M. e C. Hadjiivanova, 2001. The complexity of pathogen defense in plant. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **27** (1-2), 101-109.
- Official Gazette of the European Communities (3 October 1990). Commission Regulation (EEC) No.2676/90: Methods of community analysis to use in wine sector.
- Oshima Y. e Ueno Y., 1993. Ampelopsins D, E, H and cis-ampelopsin E, oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *Hancei* roots. *Phytochemistry*, **33** (1) 179-182.

- Pascoe I.G., J. Edwards, J.H. Cunnington, E.H. Cottrel, 2004. Detection of the *Togninia teleomorph* of *Phaeoacremonium aleophilum* in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*, **43**, 51-58.
- Pearce R.B., 1996. Transley Review No. 87, Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol.*, **132**, 203-233.
- Pearce R.B., P.P. Edwards, T.L. Green, P.A. Anderson, B.J. Fisher, T.A. Carpenter, L.D. Hall, 1997. Immobilized long-lived free radicals at the host-pathogen interface in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**, 371-390.
- Pearce R.B., 2000. Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture*, **26** (1), 1-11.
- Pierre J. L., M. Fontecave and R. R. Crichton, 2002. Chemistry for essential biological process : the reduction of ferric iron. *Biometals*, **15**, 341-346.
- Pignatello J.J., 1992. Dark and photoassisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 944-951.
- Pimentel D., 1995. Amounts of pesticide reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics*, **8**, 17-29.
- Pool R.M., L.L. Creasy, A.S. Frackelton, 1981. Resveratrol and viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis*, **20**, 136-145.
- Pryce R. J. e P. Langcake 1977. α -viniferin an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, **16**, 1452-1454.
- Ralph S., L. Landucci, J. Ralph, 2004. NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds. <http://www.dfrc.ars.usda.gov>, sotto la sezione prodotti e servizi, database.
- Rao C.N.R., 1963. Chemical application of infrared spectroscopy. Academic Press New York and London.
- Rioux D., M. Nicole, M. Simard, G.B. Ouellette, 1998. Immunocytochemical Evidence that Secretion of Pectin Occurs During Gel (Gum) and Tylosis Formation in Trees. *Phytopathology*, **88** (6), 494-505.
- Rooney S.N. e W.D. Gubler, 2001. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, S467-S472.

- Ros-Barcelò A., F. Pomar, M. Lopez-Serrano, P. Martínez, M.A. Pedreño, 2002. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 325-332.
- Salisbury F.B. e C.W. Ross, 1994. Fisiologia vegetale. Zanichelli editore.
- Santos C., S. Fragoeiro, H. Valentim, A. Philips, 2006. Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae*, **107**, 123-130.
- Sarig P., Y. Zutkhi, A. Monjauze, N. Lisker, R Ben-Arie, 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**, 337-347.
- Schulze-Lefert P. e S. Robatzek, 2006. Plant Pathogens Trick Guard Cells into Opening the Gates. *Cell*, **126**, 831-834.
- Schwarze F.W.M.R. e S. Baum, 2000. Mechanisms of reaction zone penetration by decay fungi in wood of beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytol.*, **146**, 129-140.
- Selitrennikoff C.P., 2001. Antifungal Protein. *Applied And Environmental Microbiology*, **67**, 2883-2894.
- Shigo A.L. e E.M. Sharon, 1970. Mapping columns of discolored and decayed tissues in sugar maple, *Acer saccharum* Marsh. *Phytopathology* **60**, 232-237.
- Soleas G.J., E.P. Diamandis, D.M. Goldberg, 1997. Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?. *Clinical Biochemistry*, **30**, 91-113.
- Sparapano, L., G. Bruno and A. Graniti, 1998. Esopolisaccaridi fitotossici sono prodotti in coltura da due specie di *Phaeoacremonium* associate al complesso del mal dell'esca della vite. *Petria*, **8**, 210-212.
- Sparapano, L., G. Bruno e A. Graniti, 2000. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium Chlamidosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 169-177.
- Surico G., G. Marchi, P. Braccini, L. Mugnai, 2000. Epidemiology of resca in same vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 190-205.
- Surico G., 2001. Towards commonly agreed answers to some basic question on esca. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Supplemento, 487-491.
- Tabacchi R., A. Fkyerat, C. Poliart, G. Dubin, 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, **39**, 156-161.

- Takaya Y., K. Yan, K. Terashima, Y. He, M. Niwa, 2002. Biogenetic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous plants. *Tetrahedron*, **58** (45), 9265-9271.
- Tanaka H., S. Itakura, A. Enoki, 2000. Phenol oxidase activity and one-electron oxidation activity in wood degradation by soft-rot deuteromycetes. *Holzforschung*, **54**, 463-468.
- Trela B.C. e A.L. Waterhouse, 1996. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1253-1257.
- Troccoli L., R. Calamassi, B. Mori, L. Mugnai, G. Surico, 2001. *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, Suplemento, S400-S406.
- Van Alfen N. C., 1989. Reassessment of plant wilt toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **27**, 533-550.
- VanEtten H.D., J.W. Mansfield, J.A. Bailey, E.E. Farmer, 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell*, **6** (9), 1191-1192.
- Walling C. e A. Goosen, 1973. Mechanism of the ferric ion catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. Effect of organic substrates. *Journal of the American Chemical Society*, **95**, (9), 2987-2991.
- Walling C., 1975. Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research*, **8**, 125-131.
- Wen-Wu L., D. Li-Sheng, L. Bo-Gang and C. Yao-Zu 1996. Oligostilbenes from *Vitis Heyneana*. *Pergamon*, **42**, 1163-1165.
- Werf H.M.G. van der, 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **60**, 81-96.
- Wilson M.A., 1987. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. PERGAMON editore.
- Wittstock U. e J. Gershenzon, 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **5**, 300-307.
- Wojtaszek P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, **322**, 681-692.
- Xioung L. e J.K. Zhu, 2002. Molecular and genetic aspects of plant response to osmotic stress. *Plant Cell and Environment*, **25**, 131-139.
- Yamazaki I. e L.H. Piette, 1990. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 13589-13594.

Il presente lavoro è stato supportato dai fondi del “Ministero per le Politiche Agricole e Forestali” nell’ambito del progetto interregionale: Esca della vite: ricerca e sperimentazione in vivaio ed in campo per la prevenzione e la cura, promosso dall’ARSIA-Toscana. Responsabile regionale: Prof. Antonio Evidente.

Ringraziamenti

Si ringraziano:

il Dott. Francesco Calzarano dell'università di Teramo per la collaborazione e per i dati sul monitoraggio dei vigneti;

il centro CERMNU dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" ed il Prof. Pellegrino Conte per l'utilizzo delle strumentazioni per le analisi spettroscopiche NMR;

la Prof.ssa Laura Mugnai dell'Università degli Studi di Firenze per aver fornito i legni.